

Coffeinbiosynthese und Primärstoffwechsel

**Eine Untersuchung über deren Zusammenhang
in Gewebekulturen und Blättern
von *Coffea arabica* L.**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung
der philosophischen Doktorwürde
vorgelegt der
Philosophischen Fakultät II
der Universität Zürich

von Peter Markus Frischknecht
von Schwellbrunn (AR)

Begutachtet von den Herren
PD Dr. T. W. Baumann
und Prof. Dr. H. Wanner

Zürich 1980 - Kohli-Druck

1981

Coffeinbiosynthese und Primärstoffwechsel

**Eine Untersuchung über deren Zusammenhang
in Gewebekulturen und Blättern
von *Coffea arabica* L.**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung
der philosophischen Doktorwürde
vorgelegt der
Philosophischen Fakultät II
der Universität Zürich

von **Peter Markus Frischknecht**
von Schwellbrunn (AR)

Begutachtet von den Herren
PD Dr. T. W. Baumann
und Prof. Dr. H. Wanner

Zürich 1980 - Kohli-Druck



INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	5
2.	Material und Methoden	11
2.1.	Pflanzen	11
2.2.	Synthese von $[2-^{14}\text{C}]$ Theobromin	11
2.3.	Gewebekulturen	13
2.3.1.	Medien	13
2.3.2.	Kultivierungstechnik	13
2.3.3.	TG-Bestimmung	14
2.3.4.	Fütterung mit radioaktiven Tracern	14
2.4.	Untersuchungen an Blättern	14
2.4.1.	Gaswechselfmessungen	14
2.4.2.	Fütterung mit radioaktiven Tracern	16
2.5.	Alkaloidbestimmung	19
2.5.1.	Extraktion und Vorreinigung	19
2.5.1.1.	Kalluskulturen	19
2.5.1.2.	Suspensionskulturen	19
2.5.1.3.	Blattmaterial	19
2.5.2.	Reinigung und Quantitierung mit DC (Extrakte der Kallus- und Suspensionskulturen) Radioaktivitätsmessung	20
2.5.3.	Reinigung und Quantitierung mit HPLC (Blattextrakte)	20
2.6.	Theoretische Berechnungsgrundlagen	21
2.6.1.	Methylierungsraten	21
2.6.2.	Mittelwerte	23
3.	Resultate	24
3.1.	Untersuchungen mit Gewebekulturen	24
3.1.1.	Wachstum und Coffeinproduktion von Kalluskulturen	24
3.1.2.	Wachstum und Alkaloidproduktion von Suspensionskulturen	25

3.1.3. Coffeinabbau	26
3.1.4. Kinetik der Coffeinbildung	28
3.1.5. Einfluss der Coffeinkonzentration im Medium	29
3.2. Untersuchungen an Blättern	31
3.2.1. Einfluss der Fütterungstechnik auf den CO_2 -Gaswechsel und den Coffeinmetabolismus	31
3.2.2. CO_2 -Gaswechsel und Coffeinmetabolismus in Abhängigkeit des Blattalters	34
3.2.3. Tagesrhythmus der Alkaloidbildung	37
3.2.4. Einfluss der Lichtstärke auf den Coffeinmetabolismus und die Nettophotosynthese	39
3.2.5. Einfluss der Temperatur auf den Coffeinmetabolismus und den CO_2 -Gaswechsel	40
4. Diskussion	44
4.1. Coffeinbildung	44
4.2. CO_2 -Gaswechsel	46
4.3. Vergleich der Coffeinbildung mit dem Primärstoffwechsel	48
5. Zusammenfassung	51
6. Literaturverzeichnis	55

1. EINLEITUNG

Der Auf- und Abbau der essentiellen Bestandteile der Zelle (Kohlenhydrate, Nukleinsäuren, Proteine) geschieht in allen Organismen in ähnlicher Weise und wird als Primärstoffwechsel bezeichnet. Daneben ist aber eine grosse Zahl metabolischer Vorgänge bekannt, welche auf einzelne Arten oder Artengruppen beschränkt sind, und auch dort nur in ganz bestimmten Organen oder Geweben während einer ganz bestimmten Entwicklungsphase ablaufen. Solche metabolische Prozesse werden unter dem Begriff "sekundärer Stoffwechsel" zusammengefasst und die daraus entstehenden Produkte werden "Sekundärstoffe" genannt. Die Bezeichnung "sekundär" darf aber nicht in diskriminierendem Sinne verwendet werden, da sehr viele dieser Stoffe eine bedeutende biologische Funktion haben, so zum Beispiel in der Regulation eines Organismus (Hormone), oder im Kampf ums Dasein (Pigmente, Pheromone oder Substanzen, welche in der Abwehr gegen Bakterien, pathogene Pilze oder andere Feinde eine Rolle spielen). Diese ökologische Bedeutung ist von HARBORNE (1977) umfassend dargestellt worden.

Obschon auch Mikroorganismen und Tiere Sekundärstoffe bilden können, werden die meisten im Pflanzenreich gefunden. Diese ungleiche Verteilung erklärt sich vermutlich daraus, dass höhere Pflanzen keine Möglichkeit einer wirksamen Ausscheidung haben. Sie sind daher gezwungen, die Abfallprodukte des Primärstoffwechsels zu reaktionsträgen Substanzen umzubauen und in der Vakuole, in Zellwänden oder in speziell ausdifferenzierten Zellen zu akkumulieren. Eine bessere Kenntnis solcher "metabolischer Ausscheidungsprozesse" könnte wesentliche Einblicke in die Zusammenhänge des Stoffwechsels geben.

Bei der Stoffgruppe der Purinalkaloide, zu welcher auch das Coffein (1,3,7-Trimethylxanthin) gehört, ist in den letzten Jahren die Biosynthese recht eingehend untersucht worden. Abb. 1 zeigt die 3 letzten Schritte der Biosynthese des

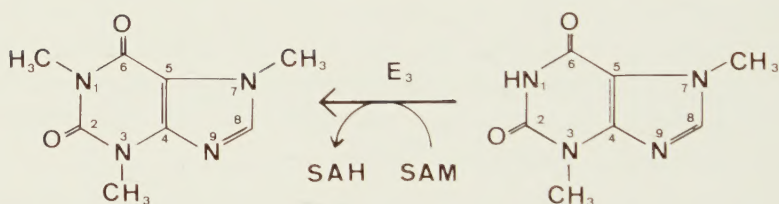
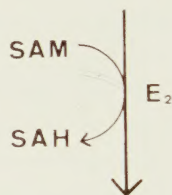
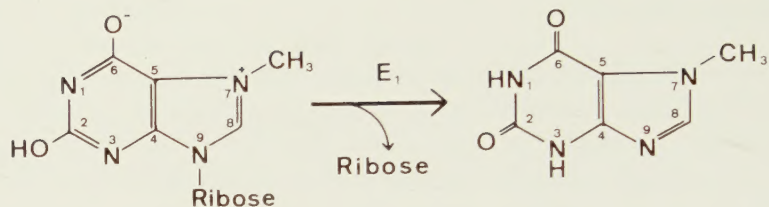


Abb. 1: Die drei letzten Schritte der Coffeinbiosynthese;

E₁ = 7-Methyl-N⁹-Nucleosid-Hydrolase;

E_{2,3} = N-Methyltransferase;

SAM = S-Adenosylmethionin;

SAH = S-Adenosylhomocystein.

Coffeins. Abgestützt auf Resultate aus Experimenten mit Blättern (BAUMANN et al. 1978) und Blattscheiben (LOOSER et al. 1974) von Coffea arabica, welche mit nicht radioaktiven Vorläufern und $[Me-^{14}C]$ -L-Methionin gefüttert worden waren, konnte gezeigt werden, dass der Biosyntheseweg vom Nukleosid 7-Methylxanthosin zum 7-Methylxanthin führt, welches über Theobromin (3,7-Dimethylxanthin) zu Coffein methyliert wird. ROBERTS und WALLER (1979) gelang es, in zellfreien Extrakten aus Kaffee Früchten (Coffea arabica) diesen Biosyntheseweg zu bestätigen und die verantwortlichen Enzyme (7-Methyl- N^9 -Nukleosid-Hydrolase und S-Adenosyl-L-Methionin-N-Methyltransferase) zu charakterisieren. In einem zellfreien System aus Blättern der Teepflanze konnten SUZUKI und TAKAHASHI (1975) ebenfalls 7-Methylxanthin und Theobromin als direkte Vorläufer des Coffeins identifizieren. Unsicher ist, ob die letzten beiden Methylierungsschritte der Coffeinbiosynthese, die in der Tee- und Kaffeepflanze gleich ablaufen, durch 2 verschiedene N-Methyltransferasen katalysiert werden.

Ueber die Natur der weiteren Vorstufen und die biochemische Verbindung zum Primärstoffwechsel besteht noch Unklarheit. Nach einer Hypothese von KREMERS (1954) ist der Ursprung beim NAD zu suchen. Aus diesem Molekül soll bei der hydrolytischen Spaltung Trigonellin (Nikotinamidteil) und Coffein (Adeninteil) entstehen. Diese Hypothese verdient besondere Beachtung, weil gezeigt werden konnte, dass $[^{14}C]$ Adenin ein guter Vorläufer in der Coffeinbiosynthese ist (SUZUKI und TAKAHASHI 1976). Allerdings kann die von KREMERS postulierte Reihenfolge der Reaktionen - Spaltung der N-glycosidischen Bindung, oxidative Desaminierung, Oxidation und Methylierung - nicht zutreffen, da, wie mehrfach gesichert (LOOSER et al. 1974, SUZUKI und TAKAHASHI 1975, ROBERTS und WALLER 1979), Xanthin weder in der Tee- noch in der Kaffeepflanze Substrat der N-Methyltransferase ist. BAUMANN et al. (1978) haben die verschiedenen Möglichkeiten der biochemischen Modifikation des Adeninteils

im NAD selber oder in anderen adeninhaltigen Nukleotiden skizziert.

Gemäss der KREMER'schen Hypothese und ihren Erweiterungen würde ein sehr enger Zusammenhang der Coffeinbiosynthese mit dem Stoffwechsel von Reduktionsäquivalenten oder Energieträgern der Zelle, also zentralen Verbindungen des Primärstoffwechsels, bestehen. Zudem wird auch postuliert, dass der Ringteil des Coffeins aus dem "purine salvage" Zyklus abgezweigt wird (SUZUKI und TAKAHASHI 1976). Auch in diesem Falle wäre die Beziehung zum Primärstoffwechsel sehr eng.

Physiologische Untersuchungen zum Coffeinstoffwechsel wurden von WEEVERS (1930) durchgeführt. Für ihn ist die Coffeinbildung eine Folge der Eiweissdisimilation, weil er bei einer Zunahme des Alkaloidgehaltes stets eine Abnahme des Eiweissgehaltes feststellte. Er fand auch den inversen Vorgang, nämlich eine starke Abnahme des Coffeingehaltes und zugleich eine Zunahme der Eiweissmenge, dies vor allem während der Samenkeimung. Da das Coffeinmolekül zu etwa 30 % aus Stickstoff besteht (Eiweiss ca. 16 %), kam er zum Schluss, dass die Purinalkaloide eine ökonomische Form der Stickstoffspeicherung darstellen und in den Samen als Reservestoffe zu betrachten sind.

Aus der gleichen Studie von WEEVERS geht hervor, dass ein Zusammenhang zwischen Wachstum und Coffeinbildung besteht, da er die grösste prozentuale Alkaloidmenge immer im Vegetationspunkt gefunden hat. Es erstaunt nicht, dass Faktoren, die das Wachstum beeinflussen, wie Temperatur, Licht, Wassergehalt des Bodens, Düngung usw., ebenfalls einen Einfluss auf die Coffeinproduktion ausüben. So berichtet PREUSSER (1967) über sehr grosse jahreszeitliche Schwankungen im Coffeingehalt von Teepflanzen (Camellia sinensis) aus russischen Freilandkulturen. Die höchsten Alkaloidgehalte in Blättern (% TG) beobachtete er jeweils in den Sommermonaten, die tiefsten im

Februar, wobei er darauf achtete, dass er Blätter gleichen Alters miteinander verglich. CHARRIER und BERTHAUD (1975) untersuchten die Schwankungen des Coffeingehaltes in Kaffeebohnen von Coffea arabica und Coffea canephora an natürlichen Standorten in der Elfenbeinküste und in Kamerun. Sie fanden, dass der Coffeingehalt zwar hauptsächlich durch den Genotyp bestimmt wird, dass aber äussere Faktoren wie Klimaverlauf während des Jahres, Stickstoffdüngegrad, Verschiedenartigkeit der Standorte, ebenfalls einen Einfluss ausüben.

Seit einiger Zeit werden auch Gewebekulturen von Pflanzenteilen angelegt. Solche in vitro Systeme eignen sich in idealer Weise für die Untersuchung von Stoffwechselvorgängen, da die äusseren Bedingungen ohne besondere Probleme konstant gehalten werden können und zudem Transportphänomene eine weniger grosse Rolle spielen. Die Produktion von sekundären Inhaltsstoffen ist jedoch häufig sehr schwach oder wechselhaft (TEUSCHER 1973, ZENK 1978). Es ist aber möglich, wie dies ZENK et al. (1977) bei Suspensionskulturen von Catharanthus roseus gelang, durch Wahl geeigneter Medien und wiederholtes Selektionieren der Klone, Zelllinien mit konstanter hoher Produktion zu erhalten.

Ueber die Purinalkaloidbildung in Gewebekulturen wurde verschiedentlich berichtet. OGUTUGA und NORTHCOTE (1970) fanden auf das TG bezogen 0,1 % Coffein in Kalluskulturen aus Stengelstücken der Teepflanze (Camellia sinensis). KELLER et al. (1972) studierten die Produktion von Coffein ebenfalls an Kalluskulturen, die aber aus dem Perikarp und dem Endosperm von Coffea arabica Früchten stammten. Sie erhielten dieses Alkaloid bis zu einem Gehalt von 2 % des TG, währenddem es BUCKLAND und TOWNSLEY (1975) in Suspensionskulturen aus Stengelstücken von Coffea arabica nur in Spuren auffanden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle des Coffeins im Stoffwechsel der Kaffeepflanze (Coffea arabica) besser abzuklären. Zu diesem Zweck wurden in Gewebekulturen und in

Blättern bei verschiedenen Bedingungen gleichzeitig ein Teil der Vorgänge im Primärstoffwechsel (TG-Zunahme, Nettophotosynthese, Dunkelatmung) und die Purinalkaloidproduktion untersucht. Um die letztere zu charakterisieren, wurde einerseits der Gehalt an Theobromin und Coffein bestimmt und andererseits durch Zugabe von $[2-^{14}\text{C}]$ Theobromin die Methylierungsrate von Theobromin zu Coffein gemessen. Unter der Annahme, dass keine Akkumulation von Zwischenprodukten stattfindet, ist die Geschwindigkeit des letzten Schrittes in einer unverzweigten Biosynthesekette identisch mit der Geschwindigkeit der gesamten Biosynthese. Da bei der Coffeinbildung keine Akkumulation von Zwischenprodukten bekannt ist - auch der Theobrominpool ist im Vergleich zur gemessenen Produktion klein -, haben wir die Methylierungsraten als ein Mass für die Geschwindigkeit der Purinalkaloidbiosynthese betrachtet.

Ein Vergleich der Daten des Primär- mit denjenigen des Coffeinstoffwechsels zeigte in den meisten Fällen eine enge Korrelation zwischen der Geschwindigkeit der Purinalkaloidbiosynthese und der Aktivität des Grundstoffwechsels.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. PFLANZEN

Alle Untersuchungen wurden mit 12 - 18 Monate alten Pflanzen verschiedener südamerikanischer Varietäten von Coffea arabica durchgeführt. Die Ausgangspflanzen für die Experimente mit Gewebekulturen wurden in unserem Gewächshaus angezogen. Für die ökologischen Versuche erfolgte die Anzucht hingegen ab dem Alter von 3 Monaten in Klimakammern (siehe 2.4.1. und Abb. 5) bei folgenden Bedingungen (Standardbedingungen): Temperatur Tag 24 °C, Nacht 18 °C; Taupunkt Tag 18 °C, Nacht 14,5 °C, Licht 12 h 120 - 150 W · m⁻². Die Pflanzen wurden alle 2 Tage begossen und 1mal in der Woche mit 0,5 %iger Wuxal-lösung (Maag AG, Dielsdorf, Schweiz) gedüngt.

2.2. SYNTHESE VON [2-¹⁴C] THEOBROMIN

Chemische Synthesemethoden wurden verschiedentlich beschrieben (FISCHER 1897, TRAUBE 1906, BREDERECK et al. 1950, AYREY und YEOMANS 1976). Die Verfahren von FISCHER und TRAUBE sind jedoch ziemlich arbeitsaufwendig und dasjenige von BREDERECK et al. konnte später nicht mehr reproduziert werden (AYREY und YEOMANS 1976). AYREY und YEOMANS erhielten eine kleine Ausbeute an [2-¹⁴C] Theobromin durch Methylierung von [2-¹⁴C] Xanthin mit Dimethylsulfat. Dieses Verfahren änderten wir ab mit dem Ziel, eine optimale Ausbeute an Theobromin zu erhalten.

In einem Vorversuch mit 0,2 mg Xanthin und 2 µCi [2-¹⁴C] Xanthin (Commissariat de l'Energie Atomique, Paris) wurde die Theobrominausbeute in bezug auf die zugegebene Menge Dimethylsulfat studiert. Xanthin wurde in 10 ml Puffer pH 9 (0,05 M Borsäure mit 0,05 M KCl) gelöst. Alle 4 Stunden wurden 20 µl Dimethylsulfat zum Reaktionsgemisch pipettiert, welches stets gerührt wurde. Die Reaktion lief bei Raumtemperatur ab, das pH wurde mit 3 N KOH auf 9,0 ± 0,1 gehalten (pH-stat E 473, Metrohm, Herisau, Schweiz). Vor jeder neuen Zugabe von Dimethylsulfat wurde ein Aliquot von 20 µl auf Dünnschicht (Kieselgel F254 Merck)

in LM System 1 (siehe 2.5.2.) chromatographiert und mit einem Dünnschichtscanner die Verteilung der Radioaktivität bestimmt. Co-chromatographierte Referenzsubstanzen waren: Xanthin, 1-Methylxanthin, 3-Methylxanthin, 7-Methylxanthin, Paraxanthin, Theobromin, Theophyllin, Coffein. Abb. 2 zeigt die Kinetik der Theobromin- und Coffeinbildung. Die sogenannte Restaktivität besteht aus Xanthin und verschiedenen unidentifizierten Substanzen mit R_F -Werten, die kleiner sind als 0,10. Die optimale Theobrominausbeute ist nach der 3. oder 4. Zugabe von Dimethylsulfat erreicht. Im Hauptexperiment wurden $80 \mu\text{Ci}$ $[2-^{14}\text{C}]$ Xanthin viermal mit $20 \mu\text{l}$ Dimethylsulfat versetzt. Am Ende der Reaktion wurden 2 Proben von je $20 \mu\text{l}$ in LM-System 1 und LM-System 2 (siehe 2.5.2.) mit denselben Referenzsubstanzen wie oben chromatographiert. Mit dem Dünnschichtscanner erhielt man die folgende relative Verteilung der Radioaktivität:

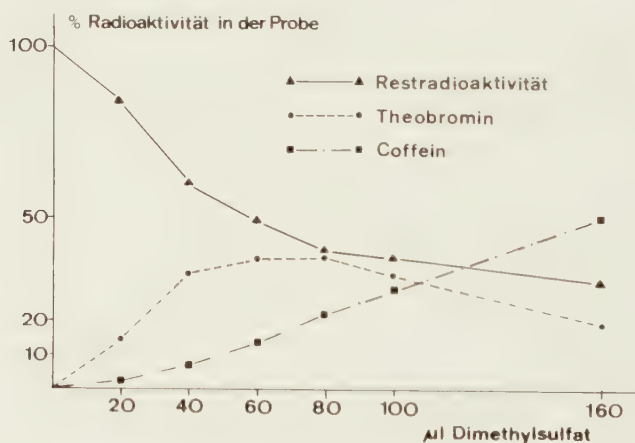


Abb. 2: Die Änderung der Radioaktivität in einem Reaktionsgemisch mit 0,2 mg Xanthin und $2 \mu\text{Ci}$ $[2-^{14}\text{C}]$ Xanthin bei pH 9 und 25°C , welchem alle 4 h $20 \mu\text{l}$ Dimethylsulfat zugegeben wurde.

Theobromin 49 %, Coffein 26 %, Restaktivität 25 %. Das Reaktionsgemisch wurde mit Wasser auf 20 ml aufgefüllt und auf eine Extrelutsäule gegeben (siehe 2.5.1.2.), welche mit 4 x 40 ml Chloroform eluiert wurde. Nach Abdampfen des Lösungsmittels wurde der Rückstand in 1 ml Chloroform gelöst und auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen (LM-System 2). Theobromin und Coffein wurden mit Wasser aus der Dünnschicht eluiert. Es wurden die folgenden Ausbeuten erzielt: Theobromin 36,5 μ Ci, entsprechend 44,5 % der ursprünglichen Radioaktivität und Coffein 19,5 μ Ci oder 23,5 %. Die radiochemische Reinheit - getestet mit dem Dünnschichtscanner - war grösser als 99 %.

2.3. GEWEBEKULTUREN

2.3.1. MEDIEN

Grundlage des festen und flüssigen Mediums war ein käufliches Medium (Flow Laboratories, Irvine, Schottland) nach MURASHIGE und SKOOG (1962). Das feste Medium enthielt zusätzlich noch folgende Komponenten (mg/l): Agar 10 000, Saccharose 30 000, Thiamin Hydrochlorid 0,9, Cystein Hydrochlorid 10, Kinetin 0,1 und 2,4-D 0,1. Im flüssigen Medium wurden die Wuchshormonkonzentrationen etwas erhöht (mg/l, Kinetin 0,2, 2,4-D 1,0) und der Agar weggelassen. Die Medien wurden mit 0,1 N NaOH auf ein pH von 5,8 gebracht und bei 120 °C während 20 - 25 min, je nach Volumen, autoklaviert.

2.3.2. KULTIVIERUNGSTECHNIK

Alle Arbeiten, die unter 2.3.2. und 2.3.3. beschrieben werden, sind unter sterilen Bedingungen ausgeführt worden.

KALLUSKULTUREN: Stengelstücke, 3 - 5 cm lang, von apikalen orthotropen Internodien wurden während 15 min in einer gesättigten Lösung von Calciumhypochlorit chemosterilisiert, anschließend 2mal mit Wasser und 1mal mit Cysteinlösung (0,01 %) gewaschen. Darauf wurden sie in einer Cysteinlösung in 5 - 10 mm lange Segmente geschnitten und in Kochgläser (2,5 x 11 cm) auf 15 ml festes Medium gebracht (Primärkulturen). Die Kulturglä-

ser wurden mit Aluminiumfolie verschlossen und im Dunkeln in einem Konstantraum bei 27 °C aufbewahrt.

Nach einer Kultivationszeit von 3 - 7 Wochen wurden die gebildeten Kalli in etwa 4 gleich grosse Teile zerlegt und auf frische Medien gebracht (Subkulturen).

SUSPENSIONSKULTUREN: Jeweils 2 g Kallusmasse, leicht zerstoßen, wurden in einen 100 ml Erlenmeyer mit 40 ml Nährlösung gegeben und im Dunkeln auf einem Reziprokschüttler bei einer Geschwindigkeit von 95 rpm/min kultiviert. Alle 12 - 15 Tage wurden die Zellen, welche grössere und kleinere Aggregate bildeten, subkultiviert.

2.3.3. TG-BESTIMMUNG

Gewebestücke aus Kalluskulturen wurden von anhaftenden Medienresten befreit und bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Bei Suspensionskulturen wurden die Zellen am Ende der Inkubationszeit vom Medium abfiltriert und bei 80 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

2.3.4. FÜETTERUNG MIT RADIOAKTIVEN TRACERN

Tracerexperimente wurden mit Suspensionskulturen durchgeführt, welche eine eingewogene Menge Zellmaterial (6 g) und Medium (34 g) enthielten. Jedem Ansatz wurde 0,1 ml der wässrigen Fütterungslösung (entsprechend $0,4 \cdot 10^5$ dpm [$2\text{-}^{14}\text{C}$] Theobromin oder $0,5 \cdot 10^5$ dpm [$2\text{-}^{14}\text{C}$] Coffein) sterilfiltriert ins Medium zugegeben. Nach 4 h, wenn der Tracer homogen zwischen Medium und Gewebe verteilt war (siehe 2.6.1.), wurde 0,5 ml Flüssigkeit aus der Kultur pipettiert, um damit die Radioaktivität zu Beginn des Versuches zu bestimmen (siehe 2.5.2.).

2.4. UNTERSUCHUNGEN AN BLÄETTERN

2.4.1. GASWECHSELMESSUNGEN

Einen Ueberblick über die Gaswechselanlage gibt Abb. 3.

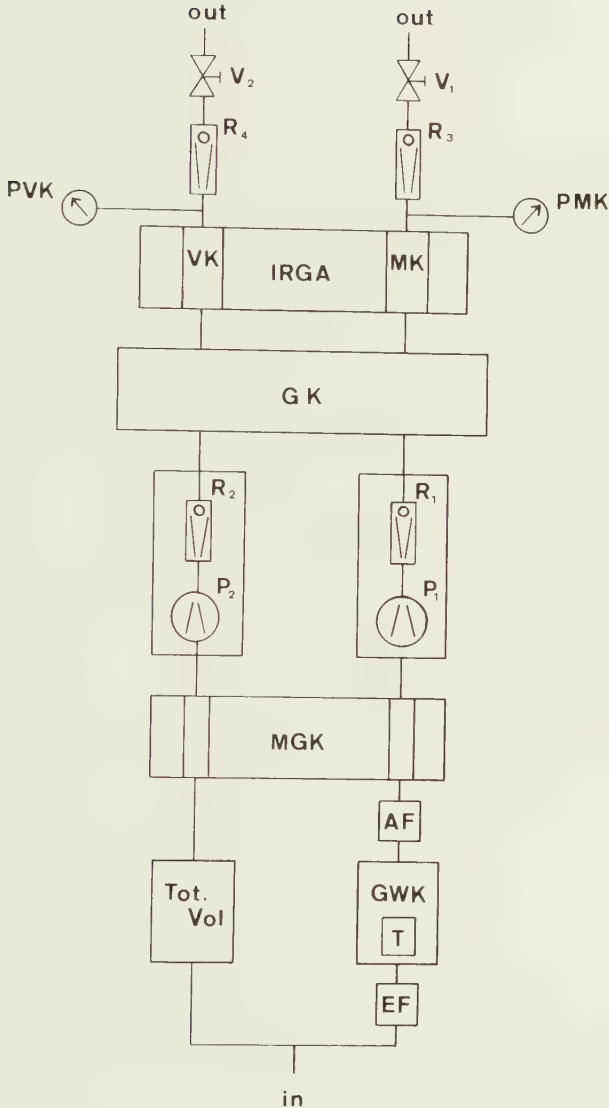


Abb. 3: Ueberblick über die Gaswechsellmessanlage; AF = Fühler Ausgangsfeuchte, EF = Fühler Eingangsfeuchte, GK = Gaskreisschaltgerät, GWK = Gaswechselküvette, IRGA = Infra-rotgasanalysator, MGK = Messgaskühler, MK = Messküvette, P_1 , P_2 = Pumpen, PMK = Manometer Messgasküvette, PVK = Manometer Vergleichsgasküvette, $R_1 - R_4$ = Rotameter, T = Temperaturfühler, Tot Vol = Totvolumen, V_1 , V_2 = Ventile, VK = Vergleichsküvette.

Die Messung der CO_2 -Konzentration erfolgte mit einem Infrarotgasanalysator URAS 1 (Hartmann und Braun AG, Frankfurt am Main). Geeicht wurde der Apparat mit 2 Eichgasen der Firma Messen Griesheim, Duisburg (Genauigkeit $\pm 2\%$). 2 Membran-Vakuumpumpen erzeugten einen Gasfluss, der mit Rotametern (0,1 - 2,5 l/min, geeicht bei 15°C und 760 Torr) gemessen wurde. Die Durchflussmenge betrug 0,8 - 1,4 l/min. Vor dem Eintritt in den Analysator wurden die beiden Gasströme in einem Wasserbad auf 2°C gekühlt.

Gaswechselkuvette und Pflanzen befanden sich in einer Klimakammer der Firma Weiss, Giessen (Typ 1000E/OJU-PR). Lichtquellen waren Philips Fluoreszenzröhren des Typs TLMF 115W 33RS, die in 3 Intensitätsstufen eingeschaltet werden konnten: Stufe I (jeweils in 50 cm Abstand vom Lampenhimmel) $58 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ bzw. $170 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, Stufe II $98 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ bzw. $360 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, Stufe III $128 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ bzw. $530 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Die Beleuchtungsstärken wurden mit einem Solarimeter, die Lichtquanten mit einem Lambdafühler gemessen. Das Klima der Kammer konnte innerhalb von $\pm 0,5^\circ\text{C}$ Luft- und Taupunkttemperatur konstant gehalten werden. Die Temperaturmessung erfolgte mit Pt-100 Widerstandsthermometern, die Feuchtemessung mit einem LiCl-Fühler.

Die Kuvette (Innenmasse 190 x 85 x 15; Abb. 4) bestand aus Plexiglas und war nicht klimatisiert. Dies hatte zur Folge, dass die Temperatur im Küvettenraum im Vergleich zur Kammer um etwa 1°C erhöht war (mit Pt-100 gemessen). Zur Kontrolle wurde vor und nach der Gaswechselkammer die Luftfeuchte mit einem Hygronfeuchtefühler Typ N bestimmt.

Die Berechnung der Gaswechselraten erfolgte nach SESTAK et al. (1971).

2.4.2. FUETTERUNG MIT RADIOAKTIVEN TRACERN

Etwa $0,2 \mu\text{Ci}$ der wässrigen $[2-^{14}\text{C}]$ Theobrominlösung wurde nach der Methode von HAGBORG (1970) mit einer Spritze durch die Spaltöffnungen in den Interzellularraum gespritzt (Abb. 5). Im Idealfall kann von einer Applikationsstelle aus das ganze

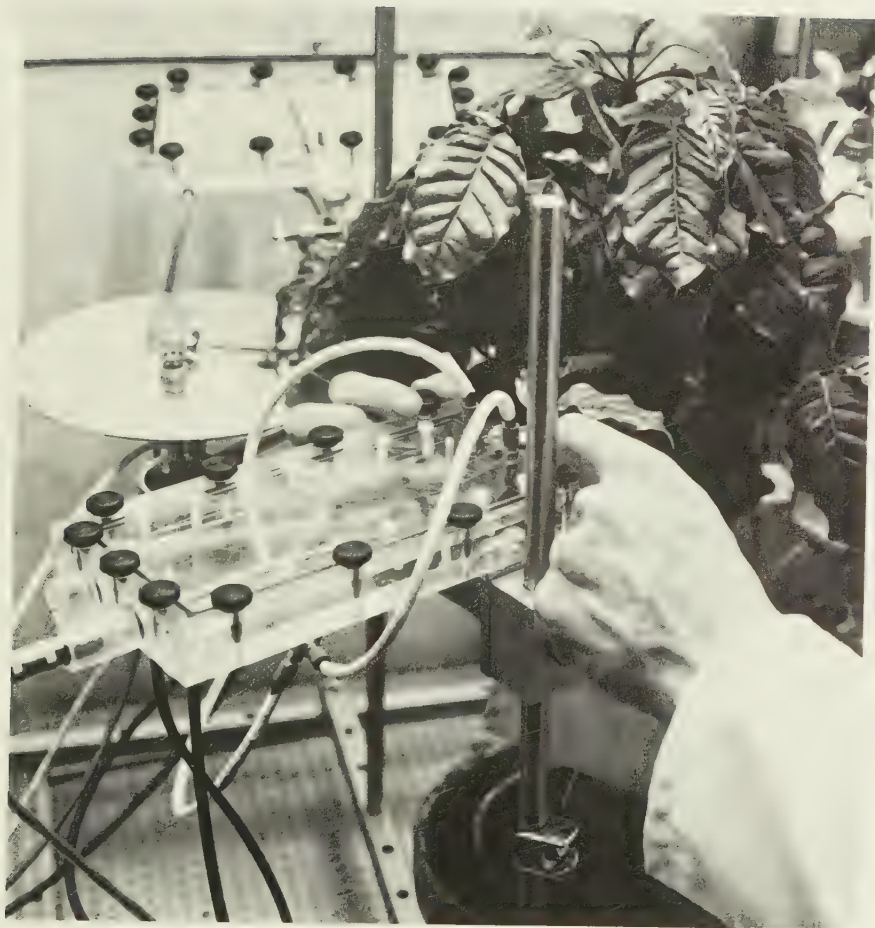


Abb. 4: Gaswechselküvette mit eingespanntem Blatt (Photo B. Meier, Schweizerischer Verkehrsverein).



Abb. 5: Anzucht von Kaffeepflanzen in einer Klimakammer; Infiltration eines Blattes nach der Methode von HAGBORG (1970) (Photo B. Meier, Schweizerischer Verkehrsverein).

Blatt infiltriert werden. Da stets ein Teil der Fütterungslösung zwischen Gummistopfen und Blatt austritt, kann die eingespritzte Menge Radioaktivität nur approximativ erfasst werden. Innerhalb von ca. 15 min verschwindet das Wasser aus den Interzellularräumen.

2.5. ALKALOIDBESTIMMUNG

2.5.1. EXTRAKTION UND VORREINIGUNG

2.5.1.1. KALLUSKULTUREN

Das Wasser wurde aus den Medien langsam abgedampft (bei 60 °C) bis eine honigähnliche Masse entstand. Die eingedickten Medien und die getrockneten Gewebestücke wurden während 20 min in 12,5 ml 0,01 N H_2SO_4 -Lösung gekocht. Anschliessend wurde 1 g Magnesiumoxid dazugegeben, das Gemisch während weiteren 20 min gekocht, abgekühlt und durch einen G4 Glasfilter filtriert (KOGAN et al. 1953, abgeändert). Der wässrige Extrakt wurde 3mal mit 1/2 Volumen Chloroform ausgeschüttelt. Bei dieser Methode beträgt der Verlust an Coffein etwa 5 %, derjenige an Theobromin 70 - 90 %.

2.5.1.2. SUSPENSIONSKULTUREN

Der pH-Wert des Mediums wurde mit 0,1 N H_2SO_4 auf 2 eingestellt und zusammen mit den getrockneten Zellen während 20 min gekocht. Danach wurde die Radioaktivität (falls vorhanden) bestimmt, um nach der Reinigung die Ausbeute bestimmen zu können. Ein Teil des Extraktes wurde auf eine Kieselgursäule (Extrelut, Merck; BREITNER et al. 1976) gebracht (1,6 ml Extrakt/1 g Extrelut). Mit 6fachem Volumen wurden Coffein und Theobromin aus der Extrelutsäule eluiert. Die Ausbeute an Coffein betrug gegen 98 %, diejenige an Theobromin gegen 90 %.

2.5.1.3. BLATTMATERIAL

Etwa 0,1 g getrocknetes Blattmaterial wurde leicht zerrieben und in 6 ml 0,0125 N H_2SO_4 gekocht. Die Weiterverarbeitung geschah wie bei 2.5.1.2.

2.5.2. REINIGUNG UND QUANTITIERUNG MIT DC (EXTRAKTE DER KALLUS- UND SUSPENSIONSKULTUREN) RADIOAKTIVITAETSMESSUNG

Nach Abdampfen des Lösungsmittels wurde der Rückstand in 1 ml Chloroform gelöst und auf eine Dünnschichtplatte (Kieselgel F254, Merck) aufgetragen. Chromatographiert wurde in folgenden LM-Systemen:

- LM-System 1: Chloroform-Methanol 19 : 1; R_F -Werte: Xanthin 0,00, 1-Methylxanthin 0,08, 3-Methylxanthin 0,10, 7-Methylxanthin 0,08, Paraxanthin 0,21, Theobromin 0,24, Theophyllin 0,28, Coffein 0,46.
- LM-System 2: Aethylacetat-Methanol-Ammoniak 8 : 2 : 1; R_F -Werte: Xanthin 0,04, 1-Methylxanthin 0,10, 3-Methylxanthin 0,15, 7-Methylxanthin 0,11, Paraxanthin 0,26, Theobromin 0,44, Theophyllin 0,23, Coffein 0,59.

Falls sich radioaktiv-markierte Substanzen auf dem Chromatogramm befanden, wurde die Verteilung mit einem Dünnschichtscanner analysiert. Anschliessend wurden Theobromin und Coffein aus der Dünnschicht eluiert und spektrophotometrisch bei 271 nm quantitiert.

Um die Radioaktivität zu bestimmen, wurde ein Aliquot (bis 1 ml) der Eluate mit 10 ml Aquasol (NEN, Boston) Zählösung vermischt und in einem Szintillationszähler des Typs Nuclear Chicago 724 gemessen. Die Berechnung der Absolutwerte (dpm) erfolgte auf Grund des Kanalverhältnisses.

2.5.3. REINIGUNG UND QUANTITIERUNG MIT HPLC (BLATTEXTRAKTE)

Der Rückstand des zur Trockene eingeeengten Chloroformeluates wurde in 1 ml Wasser gelöst und an einer HPLC-Anlage (Waters Associates) aufgetrennt. Die Säule (300 x 4 mm) war mit Li-Chrosorb Rp-18 Teilchen gefüllt (Partikelgrösse 10 μ m, Merck). Chromatographiert wurde mit einem Wasser-Methanol Gemisch von 82 : 18 v/v, bei einem Fluss von 3 ml/min und einem Druck von ca. 2200 PSI. In diesem System erhielt man folgende k' -Werte:

Coffein 8,2, Theobromin 1,8, Paraxanthin 3,1 und Theophyllin 3,5. Die Detektion geschah spektrophotometrisch bei 271 nm. Durch Peakintegration mit einem Dataprozessor von Waters Associates wurden die einzelnen Substanzen quantitativ erfasst. An der HPLC-Anlage war ein Durchflussszintillationszähler angeschlossen, um die ungefähre Radioaktivitätsverteilung in einer Probe zu bestimmen. Zusätzlich wurden die Theobromin und Coffein Fraktionen aufgefangen und mit dem Szintillationszähler die dpm-Werte bestimmt (siehe 2.5.2.).

2.6. THEORETISCHE BERECHNUNGSGRUNDLAGEN

2.6.1. METHYLIERUNGSRATEN

Als Grundlage für die Berechnung der Methylierungsraten wurde eine einfache exponentielle Abnahme des Tracers im Theobromin-pool angenommen (Gleichung 1).

$$(1) \quad q_t = q_0 \cdot e^{-kt}$$

q_0 = zu Beginn des Versuchs zugegebene Radioaktivität
 q_t = gemessene Radioaktivität zum Zeitpunkt t

Durch Logarithmieren und Umgruppieren von Gleichung 1 kann nach der Verdünnungskonstanten k aufgelöst werden (Gleichung 2).

$$(2) \quad k = \frac{\ln q_0 - \ln q_t}{t}$$

Multipliziert man den k -Wert aus Gleichung 2 mit dem Theobromin-pool, so erhält man die Methylierungsrate oder -geschwindigkeit des Theobromins (Gleichung 3).

$$(3) \quad MR = TP \cdot k$$

MR = Methylierungsrate des Theobromins
 TP = Theobrominpool

Die Methylierungsgeschwindigkeit in Suspensionskulturen, die mit Theobromin stimuliert worden sind, wurde nach Gleichung 4 berechnet.

$$(4) \text{ MR} = \frac{\text{CP} - \text{CPP}}{t} + \text{MR}_u$$

CP = Coffeinpool

CPP= Coffeinpool aus dem Parallel-
experiment ohne Stimulation
mit Theobromin

MR_u= Methylierungsrate des Theobromins
aus dem Parallelexperiment ohne
Stimulation mit Theobromin

Es müssen 3 Voraussetzungen erfüllt sein, um die Methylierungs-
raten auf die oben dargestellte Weise berechnen zu können.

1. Neben der Methylierung dürfen mit Theobromin als Substrat
keine weiteren biochemischen Reaktionen ablaufen (ausser
wenn die Geschwindigkeiten um 2 - 3 Potenzen kleiner sind).
2. Das zugegebene Theobromin muss sich im endogenen Theobro-
minpool homogen verteilen.
3. Der Theobrominpool muss in einem "steady state" Gleichge-
wicht sein.

In den vorliegenden beiden Systemen (Gewebekultur und Blatt)
werden Punkt 1 und 2 gut erfüllt. In keinem Experiment konnte
neben $[2-^{14}\text{C}]$ Theobromin und $[2-^{14}\text{C}]$ Coffein ein weiterer radio-
aktiver Metabolit gefunden werden, selbst wenn der wässrige
Extrakt ohne Vorreinigung direkt auf ein DC aufgetragen und
dieses mit dem Dünnschichtscanner geprüft wurde.

Die zweite Voraussetzung lässt sich bezüglich der Gewebekul-
turen relativ einfach überprüfen, indem man die Verteilung des
Theobromins zwischen Gewebe und Medium mit derjenigen des Tra-
cers vergleicht. Nach etwa 4 h Inkubationszeit stimmen die bei-
den überein. Aber auch in den Blättern erreicht das radioaktive
Theobromin quantitativ den Ort der Alkaloidbiosynthese. Bei ge-
nügung langer Expositionszeit wird 97 % des Tracers zu Coffein
umgewandelt.

Relativ schlecht erfüllt ist Voraussetzung Nr. 3. Sowohl in den
Gewebekulturen als auch in den Blättern kann der Theobrominge-
halt während der Versuchsdauer um bis zu 20 % zu- oder abnehmen.

2.6.2. MITTELWERTE

Da in den Blättern die entwicklungsbedingten Unterschiede des Theobromingehaltes und der Geschwindigkeit der Coffeinbiosynthese so gross sind (siehe 3.2.2.), dass die Stichproben auch angenähert nicht normalverteilt sind, stellen sich Probleme bei der Berechnung der Durchschnittswerte. Das arithmetische Mittel ist unter diesen Voraussetzungen nicht sinnvoll. Die durchschnittlichen Theobromingehalte werden daher durch die medianen Werte der Stichprobenreihe ausgedrückt. Die durchschnittliche Geschwindigkeit der Coffeinbiosynthese wurde folgendermassen berechnet: Die gemessene Methylierungsrate wird durch eine theoretisch erwartete Methylierungsrate dividiert, welche anhand des Theobromingehaltes aus Abb. 13 herausgelesen wird. Der Quotient, in der Folge als Methylierungskoeffizient bezeichnet, stellt eine Grösse dar, die unabhängig ist vom Entwicklungszustand des Blattes. Die Logarithmen dieses Wertes ergeben eine normalverteilte Stichprobenreihe, von welcher das arithmetische Mittel berechnet werden kann. Durch Delogarithmieren und Multiplizieren mit dem medianen Erwartungswert erhält man die gesuchte durchschnittliche Methylierungsgeschwindigkeit. Die übrigen Daten konnten arithmetisch gemittelt werden.

3. RESULTATE

3.1. UNTERSUCHUNGEN MIT GEWEBEKULTUREN

3.1.1. WACHSTUM UND ALKALOIDPRODUKTION VON KALLUSKULTUREN

In Primär- und Subkulturen wurden Wachstum und Coffeinbildung studiert (Abb. 6A, 6B). Coffein wird in relativ grosser Menge synthetisiert, verglichen mit der im allgemeinen tiefen in vitro Produktion sekundärer Pflanzenstoffe. Im Durchschnitt hat eine 49 Tage alte Kultur 25mal mehr Coffein als das Inokulum. Der prozentuale Gehalt (bezogen auf das TG) beträgt 1,0 - 1,6 % und entspricht etwa demjenigen einer Kaffeebohne.

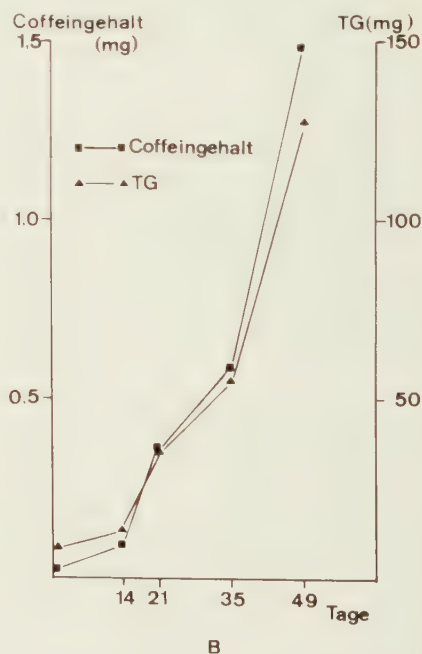
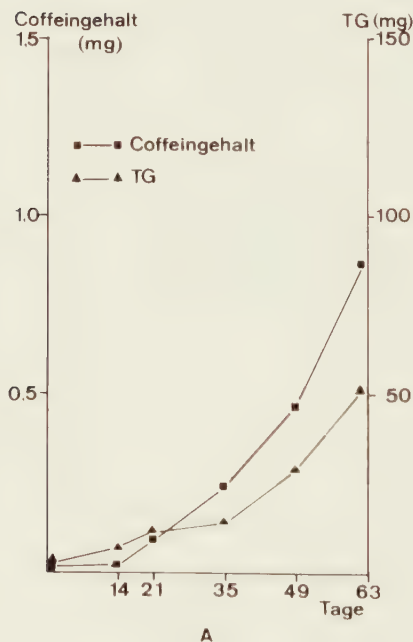


Abb. 6: Wachstum und Coffeingehalt von Kalluskulturen; Durchschnittswerte aus jeweils 5 - 6 Kulturen.

Wie eine Regressionsanalyse zeigt, ist das Kalluswachstum sowohl in Primär- als auch Subkulturen exponentiell, mit einer Verdoppelungszeit von 12 - 13 Tagen. Der Coffeingehalt nimmt in beiden Kulturtypen parallel dem Trockengewicht zu. Dies bedeutet, dass die Produktionsrate pro Einheit TG während der ganzen Kulturdauer mehr oder weniger konstant ist. Absolut findet man das Coffein schon nach kurzer Kultivationszeit zur Hauptsache im Medium, die Konzentration ist jedoch im Gewebe stets höher als im Medium.

3.1.2. WACHSTUM UND ALKALOIDPRODUKTION VON SUSPENSIONSKULTUREN

Während 1 1/2 Jahren wurden Suspensionskulturen als kontinuierliche Zelllinien gehalten und die Coffein- und Theobrominbildung untersucht. Ihr Alkaloidgehalt ist im Vergleich zu den Kalluskulturen tiefer und variiert sehr stark (0,03 - 0,7 %). Die Alkaloidproduktion ist von Zelllinie zu Zelllinie verschieden und kann sich auch von einer Subkultur zur anderen verändern. Wir beobachteten oft eine direkte Proportion zwischen der Grösse der Zellaggregate und der Alkaloidproduktion. Zur Analysezeit waren Coffein und Theobromin immer gleich dem Volumenverhältnis Gewebe zu Nährmedium verteilt. Dies lässt auf einen freien Austausch der beiden Purinalkaloide in diesem System schliessen.

Die Zunahme des Alkaloidgehaltes und des Trockengewichtes während einer Kultivationszeit von 20 Tagen ist in Abb. 7A (stark produzierende Kultur) und 7B (schwach produzierende Kultur) dargestellt. Das Wachstum der Kultur ist unabhängig von der Purinalkaloidproduktion. Nach einer lag-Phase, deren Dauer von der Zellkonzentration am Anfang abhängt, steigt das Trockengewicht auf etwa 0,65 - 0,70 g/Kultur an (Wachstumsphase etwa 5 Tage) und bleibt dann konstant. Die Purinalkaloidbildung nimmt während der ganzen Inkubationszeit mehr oder weniger exponentiell zu. Das heisst, dass der grösste Teil des Endgehaltes nach der Wachstumsphase gebildet wird. 25 - 50 % des totalen Alkaloidgehaltes liegen als Theobromin

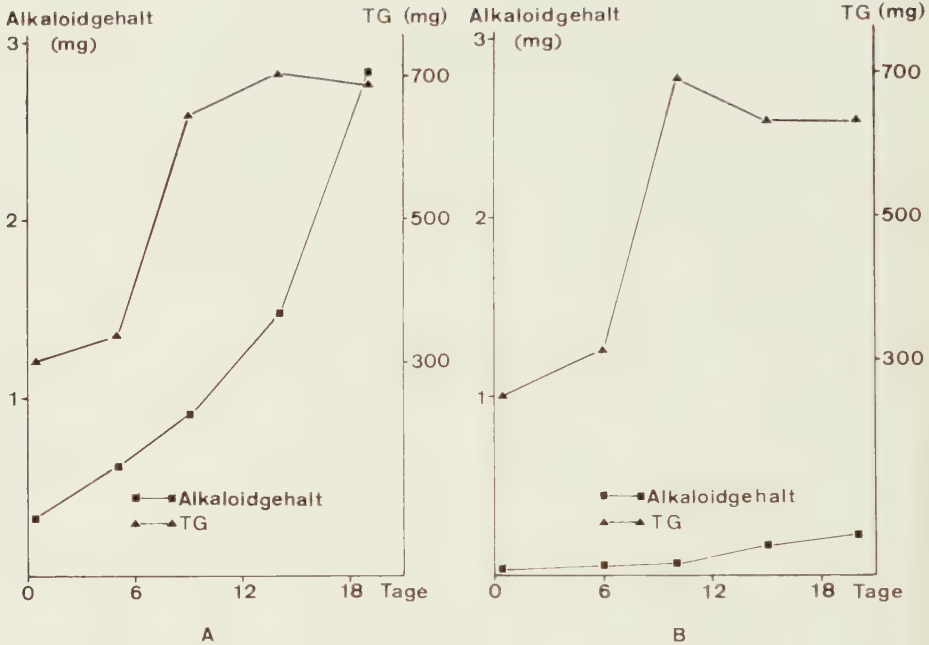


Abb. 7: Wachstum und Purinalkaloidgehalt (Theobromin und Coffein) einer stark produzierenden (A) und einer schwach produzierenden (B) Suspensionskultur.

vor, ein Wert, der beträchtlich höher ist, als in der intakten Pflanze.

In stark produzierenden Kulturen kann eine charakteristische Veränderung der relativen Anteile an Theobromin und Coffein im Verlaufe einer Kultivationsperiode festgestellt werden (Abb. 8). Der prozentuale Anteil an Theobromin sinkt von beinahe 50 % nach der lag-Phase auf ein Minimum von 25 % am Ende der Wachstumsphase und steigt dann am Ende der Kultivationszeit wieder auf 40 % an.

3.1.3. COFFEINABBAU

Obschon Coffein als Endprodukt einer Biosynthesekette betrachtet werden kann, kann es in der Kaffeeepflanze vor allem in den

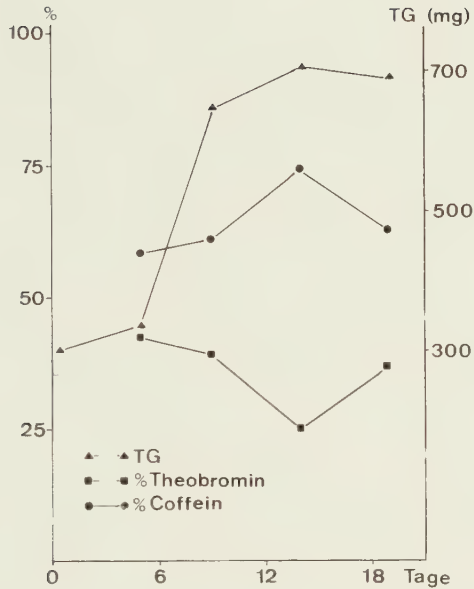


Abb. 8: Wachstum und relativer Gehalt an Theobromin und Coffein einer stark produzierenden Suspensionskultur.

alten Blättern langsam abgebaut werden. (KALBERER 1965). Um zu testen, ob unsere Suspensionskulturen fähig sind, dieses Purin-alkaloid abzubauen, wurden Zelllinien von stark und schwach produzierenden Kulturen mit 2 mg nicht radioaktivem und 0,2 μCi $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ Coffein gefüttert. Nach 23 Tagen konnte 84 % der zugegebenen Radioaktivität im Coffein wiedergefunden werden. Neben Spuren von radioaktivem Theobromin konnten mit dem Dünnschichtscanner keine weiteren, markierten Zwischenprodukte entdeckt werden, obschon in diesen Analysen ein Aliquot des Mediums direkt auf das Chromatogramm aufgetragen wurde. Somit kann Coffein also auch im in vitro System als ziemlich stabiles Endprodukt betrachtet werden.

3.1.4. KINETIK DER COFFEINBILDUNG

Zu 3 verschiedenen Zeitpunkten einer Kultivationsperiode wurden 2 stark und 2 schwach produzierende Kulturen mit $[2-^{14}C]$ Theobromin gefüttert, zu einer der beiden wurde zusätzlich 1,8 mg nicht radioaktives Theobromin gegeben, in der Absicht, den letzten Methylierungsschritt zu "stimulieren". Nach 3 Tagen Inkubationszeit wurden die Kulturen analysiert und die Methylierungsraten berechnet (Abb. 9).

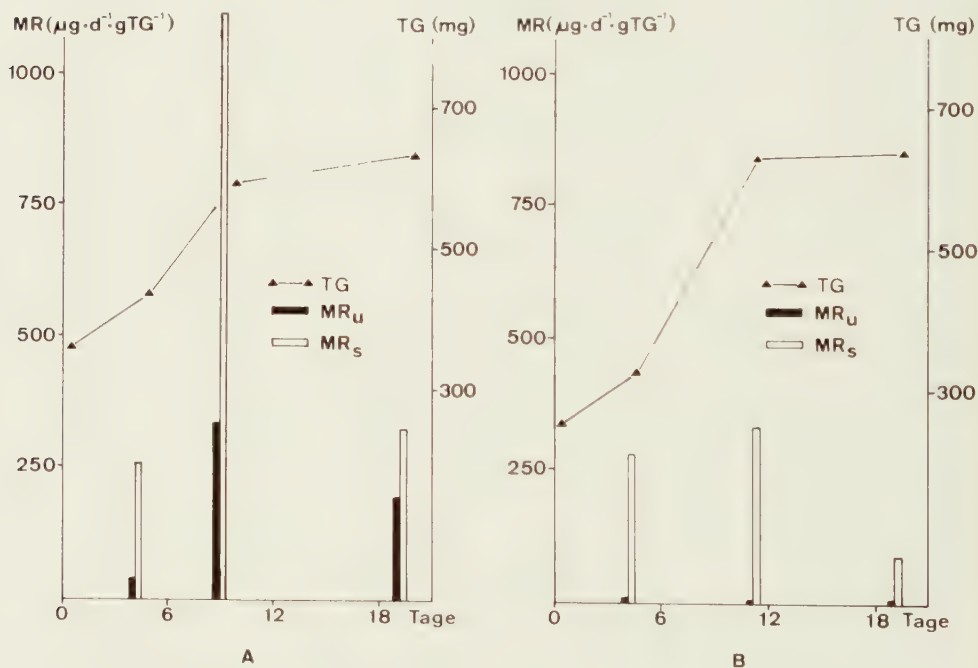


Abb. 9: Wachstum und Methylierungsrate einer stark produzierenden (A) und einer schwach produzierenden (B) Suspensionskultur; MR_U = Methylierungsrate ohne Zugabe von Theobromin; MR_S = Methylierungsrate nach Zugabe von 1800 µg Theobromin.

Während der Wachstumsphase ist die Coffeinbildung am schnellsten und kann dann durch Zugabe von Theobromin am meisten gesteigert werden. Nach der Wachstumsphase wird zwar, wie bereits erwähnt, der grösste Teil des Endgehaltes an Purinalkaloiden gebildet (Abb. 7), die Methylierungsrate sinkt aber ab und lässt sich durch die Zugabe des Präkursors nicht mehr wesentlich steigern. Dies erklärt auch die Veränderung der relativen Anteile der beiden Alkaloide während einer Kultivationsperiode (Abb. 8). In schwach produzierenden Kulturen kann die Coffeinbildung durch die Zugabe von Theobromin etwa 30mal erhöht werden, die Produktionsrate ist gegenüber der stimulierten stark produzierenden Kultur aber trotzdem noch 3mal niedriger.

3.1.5. EINFLUSS DER COFFEINKONZENTRATION IM MEDIUM

In diesem Experiment liess man Kulturen auf Medien mit verschiedenen, vorgegebenen Coffeinemengen wachsen. Aus Tab. 1 ist ersichtlich, dass eine hohe Alkaloidkonzentration im Medium ein Ansteigen der Alkaloidkonzentration im Kallusstück bewirkt. Ab einem relativen Gehalt von etwa 400 $\mu\text{g/ml}$ Gewebe werden Wachstum und Coffeinproduktion beeinträchtigt. Auf das Trockengewicht bezogen, bleibt die Alkaloidproduktion jedoch bei allen Ansätzen etwa gleich hoch; die beiden Parameter werden gleich stark beeinflusst.

Tab. 1: TG und Coffeingehalt von Kalluskulturen nach 35 Tagen Kulturdauer auf Medien mit verschiedenen vorgegebenen Coffeimengen; Durchschnittswerte aus jeweils 3 Kulturen.

Kultur Art Dauer	Vorgegebene Coffeinkonz. ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	TG (mg)	Isoliertes Coffein Medium Gewebe Gesamt		Neugeb. Coffein (μg)	Coffein Produktion ($\mu\text{g} \cdot \text{mgTG}^{-1}$)	Coffeinkonz. Medium Gewebe ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	
			(μg)	(μg)				
PK 35	0	54	810	200	1010	19	54	410
PK 35	40	28	1000	160	1160	20	67	550
PK 35	160	19	2460	230	2690	15	160	1330
PK 35	640	14	9550	430	9980	28	640	4000
SK 35	0	24	590	60	650	27	39	270
SK 35	40	23	1070	70	1140	23	71	300
SK 35	160	15	2580	60	2640	16	170	410
SK 35	640	8	9660	70	9730	16	640	950

3.2. UNTERSUCHUNGEN AN BLÄTTERN

3.2.1. EINFLUSS DER FÜETTERUNGSTECHNIK AUF DEN CO_2 -GAS-WECHSEL UND DEN COFFEINMETABOLISMUS

In Abb. 10 ist der Tagesgang der Nettophotosynthese und der Dunkelatmung eines jungen, ausgewachsenen Blattes bei Standardbedingungen (siehe 2.1.) vor und nach einer Infiltration mit Fütterungslösung aufgezeichnet.

Der Verlauf der CO_2 -Aufnahme des noch nicht behandelten Blattes lässt sich in 4 verschiedene Phasen unterteilen: Nach einer 1. Phase der Aequilibration von 1 - 2 Stunden nach Einschalten des Lichtes bleibt die Photosyntheserate in der 2. Phase während 4 - 6 Stunden auf einem konstanten Wert, der zwischen $10 \text{ und } 15 \text{ mg CO}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{gTG}^{-1}$ bzw. $5 - 7 \text{ mg CO}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{dmBF}^{-2}$ liegt. Die nächste Phase, die etwa 4 Stunden dauert, ist durch eine unregelmässige Abnahme der Assimilationsleistung um 30 - 70 % gekennzeichnet. In der darauffolgenden letzten Phase bleibt die Photosyntheserate auf einem reduzierten Niveau nochmals 1 - 2 Stunden bis zum Ausschalten des Lichtes konstant. Dieser Tagesgang muss als Charakteristikum der Photosynthese unserer Kaffeepflanzen betrachtet werden, da er auch nach allen Veränderungen der Standardbedingungen auftrat. In den folgenden Aufstellungen sind die Werte der Assimilationsraten immer über den ganzen Tag gemittelte Durchschnitte.

Die CO_2 -Abgabe in der Nacht liegt zwischen 0,8 und 1,2 $\text{mg CO}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{gTG}^{-1}$ und verläuft konstant.

Eine Infiltration mit Fütterungslösung (Abb. 10) verändert die oben beschriebene CO_2 -Gaswechsel-Charakteristik praktisch nicht. Unmittelbar nach der Behandlung sinkt die Assimilationsrate auf null ab, nach etwa einer halben Stunde, wenn das eingespritzte Wasser aus dem Interzellularraum ausgetreten ist, steigt die CO_2 -Aufnahme relativ schnell wieder an und verläuft in der Folge gleich wie am Tag vor der Infiltration. Quantitativ ist die Photosyntheseleistung - gemittelt vom Zeitpunkt der Infiltra-

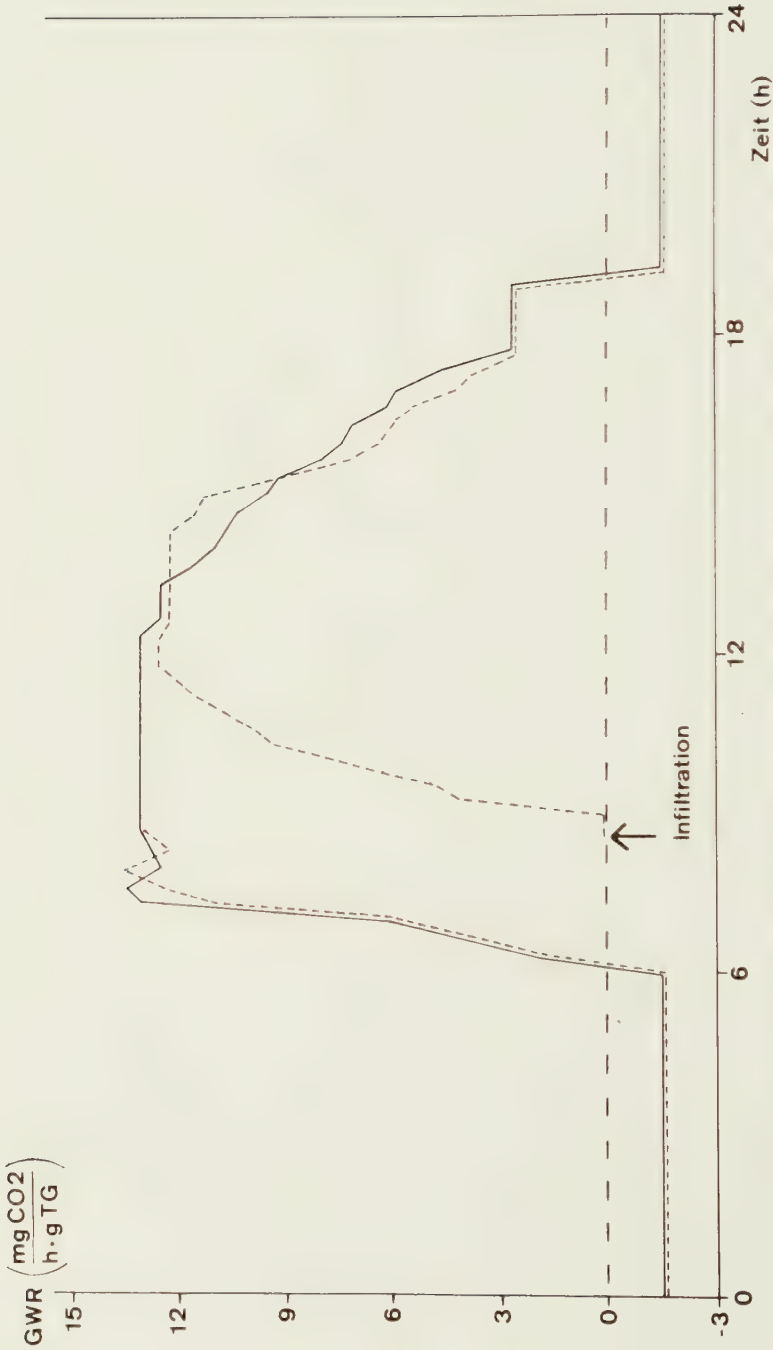


Abb. 10: Tagesgang der Nettophotosynthese und der Dunkelatmung eines jungen, ausgewachsenen Blattes bei Standardbedingungen (Temperatur: Tag 24 °C, Nacht 18 °C, Taupunkt: Tag 18 °C, Nacht 14,5 °C, Licht 12 h Stufe III) vor und nach einer Infiltration mit Fütterungslösung; ausgezogene Linie: Tag vor der Infiltration, gestrichelte Linie: Infiltrationstag (Infiltration 08.30).

tion bis zum Ausschalten des Lichtes - um etwa 15 % erniedrigt. Auch in den darauffolgenden Tagen erreicht die Assimilation nicht mehr den Wert wie vor der Infiltration, nach 3 Tagen wird noch eine ca. 10 %ige Einbusse gemessen. Ein Einfluss auf die Dunkelatmung konnte durch diesen Eingriff von aussen nicht festgestellt werden.

Die Beeinflussung des Coffeinmetabolismus durch die Fütterungstechnik konnte nicht direkt untersucht werden. Es wurde jedoch in den Tacerexperimenten mit radioaktivem Theobromin beobachtet, dass die Methylierungskoeffizienten, welche als ein relatives Mass für die Methylierungsgeschwindigkeiten gelten (siehe 2.6.2.), kleiner sind, wenn die Zeit zwischen Infiltration und Ernte verkürzt wird (Abb. 11). Es scheint, dass die Methylierungsreaktion unmittelbar nach der Infiltration ziemlich stark gehemmt ist, sich aber nach ein paar Stunden wieder erholt.

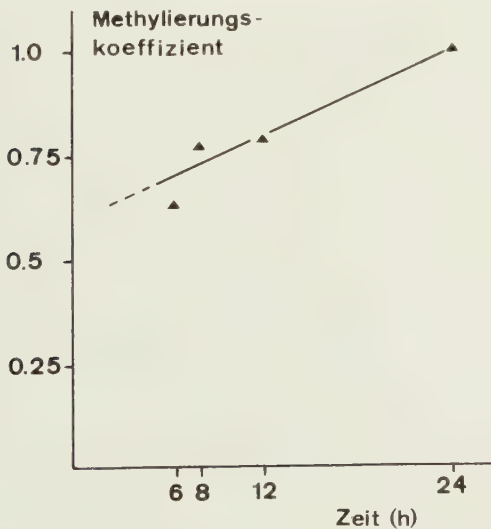


Abb. 11: Beeinflussung des Coffeinmetabolismus durch die Fütterungstechnik; Abhängigkeit der Methylierungskoeffizienten von der Versuchsdauer.

3.2.2. CO₂-GASWECHSEL UND COFFEINMETABOLISMUS IN ABHAENGIGKEIT DES BLATTALTERS

Die Untersuchungen wurden bei Standardbedingungen an vier aufeinanderfolgenden Blättern eines Zweiges durchgeführt (Abb. 12). Die Blätter unterschieden sich morphologisch nebst der Blattfläche durch eine mit dem Alter zunehmende Festigkeit und intensivere Grünfärbung. In Tab. 2 sind die Ergebnisse dieser Untersuchung zusammengefasst. Grundsätzlich kann festgestellt werden, dass der Sekundärstoffwechsel bedeutend stärker vom Entwicklungszustand des Blattes abhängt als der Primärstoffwechsel.

Die Geschwindigkeit der Coffeinsynthese nimmt von $1750 \mu\text{g} \cdot \text{gTG}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (Altersstufe 1) auf $16 \mu\text{g} \cdot \text{gTG}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (Altersstufe 4) ab. In der gleichen Entwicklungsspanne sinkt auch der Gehalt an Theobromin um 2 Zehnerpotenzen. Eine Regressionsanalyse zeigt, dass zwischen den beiden Parametern eine sehr enge Korrelation ($r^2 = 0,96$) besteht (Abb. 13). Sowohl der Gehalt an Theobromin



Abb. 12: Morphologie der Blätter der 4 untersuchten Altersstufen.

Tab. 2: Coffeinmetabolismus und CO₂-Gaswechsel bei Standardbedingungen (Temperatur 24 °C Tag, 18 °C Nacht; Taupunkt 18 °C Tag, 14,5 °C Nacht; Beleuchtungsstufe III 12 h) in Abhängigkeit des Blattalters; Altersstufe 1 entspricht den jüngsten, Altersstufe 4 den ältesten Blättern; Durchschnittswerte aus jeweils 3 Blättern.

Alters- stufe	TG (mg)	Theobromin- gehalt ($\mu\text{g} \cdot \text{gTG}^{-1}$)	MR ($\mu\text{g} \cdot \text{gTG}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)	Coffein- gehalt (%TG)	Phn ($\frac{\text{mgCO}_2}{\text{h} \cdot \text{gTG}}$)	Rd ($\frac{\text{mgCO}_2}{\text{h} \cdot \text{gTG}}$)
1	12	2900	1750	2,3	4,0	2,5
2	30	620	470	1,5	6,0	1,3
3	37	54	67	1,5	6,8	0,9
4	45	15	16	1,7	6,8	0,8

als auch die Geschwindigkeit der Coffeinbiosynthese sind also durch den Entwicklungszustand des Blattes determiniert.

Der Gehalt an Coffein hingegen (in % des TG) ist keinen derart starken Schwankungen unterworfen. Mit 2,3 % ist er ebenfalls in den ganz jungen Blättern am höchsten, danach sinkt er auf 1,5 - 1,7 % ab. Die Gaswechsellmessungen ergaben mit zunehmendem Blattalter ein Ansteigen der Assimilationsraten und ein Absinken der Dunkelatemungsraten. Die Werte ändern sich jedoch ab Altersstufe 3 nur noch wenig. Die aus dem Gasaustausch resultierende Stoffproduktion nimmt also im Verlauf der Blattentwicklung stetig zu.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein ausdifferenziertes Blatt durch eine maximale Assimilationsrate, eine minimale Dunkelatemungsrate und eine praktisch versiegelte Coffeinbiosynthese charakterisiert ist.

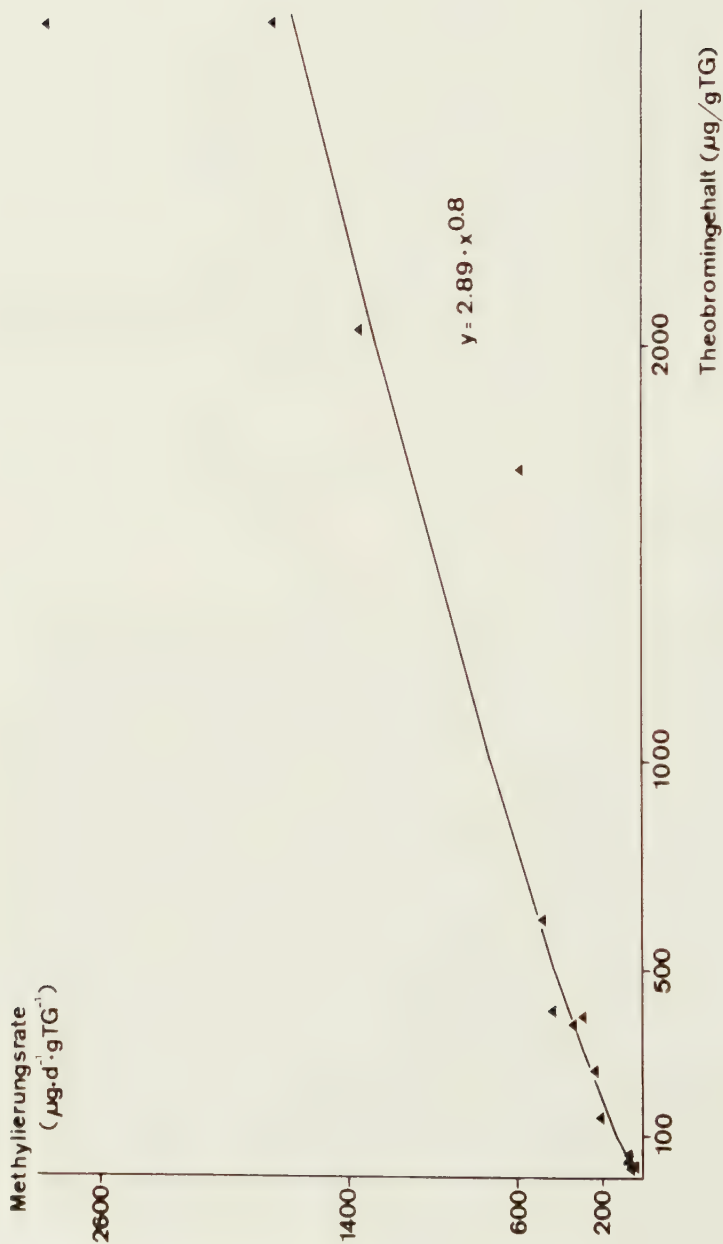


Abb. 13: Korrelation zwischen Theobromingehalt und Methylierungsrate; für die Regressionsanalyse wurden 20 Wertepaare berücksichtigt, in der Abbildung wurden jedoch nur 14 eingezeichnet.

3.2.3. TAGESRHYTHMUS DER ALKALOIDBILDUNG

In 2 Experimenten wurde untersucht, ob die Coffeinbiosynthese während 24 h gleichmässig schnell verläuft. Im 1. Versuch verglich man die Alkaloidproduktion während der Lichtperiode (06.00 - 18.00, Beleuchtungsstufe III) mit derjenigen während der Dunkelperiode (18.00 - 06.00), im 2. diejenige des Vormittags (06.00 - 12.00) mit derjenigen des Nachmittags (12.00 - 18.00), beide bei Beleuchtungsstufe III. Während der gesamten Dauer der 2 Versuche war die Temperatur auf 24 °C und der Taupunkt auf 18 °C eingestellt, entsprechend den Standardbedingungen am Tag.

Um entwicklungsbedingte Unterschiede so klein wie möglich zu halten, wurden für die einzelnen Ansätze (Tag/Nacht bzw. Vormittag/Nachmittag) jeweils Blattpaare verwendet.

Wie aus Tab. 3 hervorgeht, ist die Methylierungsgeschwindigkeit des Theobromins am Tag und in der Nacht etwa gleich gross, der Gehalt an Theobromin ist jedoch nach der Dunkelperiode etwa 20 % tiefer als nach der Lichtperiode. Der Methylierungskoeffizient (siehe 2.6.2.) ist daher in der Nacht leicht höher als am Tage.

Zwischen dem Coffeinmetabolismus am Vormittag und am Nachmittag (Tab. 4) konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Die Purinalkaloidbiosynthese als Ganzes zeigt also einen deutlichen Tag- Nacht-Rhythmus, wobei aber diese kurzfristigen Schwankungen durch den Theobrominpool aufgefangen werden und sich nicht auf die Methylierungsrate und den Coffeingehalt auswirken. Dies bedeutet, dass die Geschwindigkeit der Methylierung zum Coffein nicht durch die Theobrominkonzentration, sondern durch die verfügbare Enzymmenge oder durch die Konzentration des Methylendonators, des 2. Substrates, begrenzt ist.

Tab. 3: Vergleich der Coffeinproduktion während der Lichtperiode (06.00 - 18.00, Beleuchtungsstufe III) mit derjenigen während der Dunkelperiode (18.00 - 06.00) bei einer Temperatur von 24 °C und einem Taupunkt von 18 °C; Durchschnittswerte aus 10 Blattpaaren.

Zeit	Theobromin- gehalt ($\mu\text{g} \cdot \text{gTG}^{-1}$)	MR ($\mu\text{g} \cdot \text{gTG}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)	MR _{koeff.}	Coffein- gehalt (%TG)
Tag	820	460	0,75	1,2
Nacht	680	430	0,81	1,2

Tab. 4: Vergleich der Coffeinproduktion am Vormittag (06.00 - 12.00) mit derjenigen am Nachmittag (12.00 - 18.00) bei einer Temperatur von 24 °C, einem Taupunkt von 18 °C und Beleuchtungsstufe III; Durchschnittswerte aus 6 Blattpaaren.

Zeit	Theobromin- gehalt ($\mu\text{g} \cdot \text{gTG}^{-1}$)	MR ($\mu\text{g} \cdot \text{gTG}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)	MR _{koeff.}	Coffein- gehalt (%TG)
Vormittag	910	410	0,61	1,3
Nachmittag	830	380	0,62	1,3

3.2.4. EINFLUSS DER LICHTSTÄRKE AUF DEN COFFEINMETABOLISMUS UND DIE NETTOPHOTOSYNTHESE

Die Messungen wurden an 4 aufeinanderfolgenden Tagen von 06.00 - 14.00 bei abnehmender Beleuchtungsstärke (Stufe III, II, I, 0; siehe 2.4.1.) durchgeführt. Temperatur und Feuchte blieben gegenüber den Standardbedingungen unverändert. Es wurden jeweils 2 einander gegenüberliegende Blattpaare verwendet, trotzdem sind die individuellen und entwicklungsbedingten Unterschiede des Theobromingehaltes und der Coffeinbiosynthese in den einzelnen Blättern zu gross, als dass man den Einfluss des Lichtes auf diese Parameter direkt beobachten könnte.

Tab. 5: Einfluss der Lichtstärke auf den Coffeinmetabolismus und die Nettophotosynthese. Temperatur während des Versuches 24 °C, Taupunkt 18 °C; Durchschnitt aus je 4 Blättern.

Licht- stufe*	Theobromin- gehalt ($\mu\text{g} \cdot \text{gTG}^{-1}$)	MR ($\mu\text{g} \cdot \text{gTG}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)	MR _{koeff.}	Coffein- gehalt (%TG)	Phn ($\frac{\text{mgCO}_2}{\text{h} \cdot \text{gTG}}$)
III	1660	830	0,76	1,2	9,9
II	1490	800	0,78	1,2	9,9
I	1920	1030	0,84	1,2	6,8
0	1640	800	0,74	1,3	-1,3

*Lichtstufe III: $128 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ bzw. $530 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$

Lichtstufe II: $98 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ bzw. $360 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$

Lichtstufe I: $58 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ bzw. $170 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$

Einen relativen Vergleich der Alkaloidproduktion geben die Methylierungskoeffizienten, welche unabhängig vom Blattalter sind (siehe 2.6.2.). Wie aus Tab. 5 ersichtlich ist, sind diese Koeffizienten bei allen 4 Lichtstufen etwa gleich gross (zwischen 0,74 und 0,84). Dies bedeutet, dass das Verhältnis zwischen Theobromingehalt und Methylierungsrate konstant ist. Da sich kleine Geschwindigkeitsänderungen in der Coffeinbiosynthese nur auf den Theobromingehalt auswirken und die letzte Methylierungsreaktion offenbar nicht tangieren (3.2.3.), kann angenommen werden, dass der Purinalkaloidstoffwechsel als Ganzes unabhängig von der Beleuchtungsstärke ist.

Die Gaswechsellmessungen zeigen, dass die Nettophotosyntheserate das Maximum zwischen Lichtstufe I und II erreicht, das heisst, die Kaffeepflanze ist zwischen 60 und 100 W'm² lichtgesättigt. Bei Stufe 0 wurde eine CO₂-Abgabe gemessen, die etwa derjenigen in der Nacht entspricht.

3.2.5. EINFLUSS DER TEMPERATUR AUF DEN COFFEINMETABOLISMUS UND DEN CO₂-GASWECHSEL

In einem 1. Experiment (Tab. 6) untersuchten wir die Veränderung des Coffein- und Theobromingehaltes an 3 Pflanzengruppen, die während 7 Tagen bei 15 °C, 24 °C und 33 °C (Dauer-temperaturen) gehalten wurden. Die übrigen Bedingungen waren in den drei Versuchen gleich: 6,5 mbar Dampfdruckdefizit und 12 h Licht Stufe III. Vor dem Experiment standen die Pflanzen in der Anzuchtammer unter Standardbedingungen (24 °C). Zu Beginn und am Ende des Versuchs wurde je ein Blatt analysiert, wobei wiederum die einem Blattpaar zugehörigen Blätter verwendet wurden, um entwicklungsbedingte Unterschiede zu vermeiden.

Eine gegenüber Standardbedingungen tiefere Temperatur bewirkt ein Absinken des Coffeingehaltes, eine höhere ein Ansteigen. In den Kontrollpflanzen (24 °C) nimmt der Coffeingehalt ebenfalls zu, was vermutlich auf die erhöhte Nachttemperatur zurückzuführen ist. Der Theobromingehalt sollte wegen des während dem Experiment zunehmenden Alters der Blätter deutlich ab-

Tab. 6: Veränderung des Coffein- und Theobromingehaltes während 7 Tagen bei 15 °C, 24 °C und 33 °C (Dauertemperaturen); übrige Bedingungen 6,5 mbar Dampfdruckdefizit und 12 h Licht Stufe III; Durchschnittswerte aus je 6 Blattpaaren.

Temperaturbedingungen		Theobromingehalt ($\mu\text{g} \cdot \text{gTG}^{-1}$)	Coffeingehalt ($\mu\text{g} \cdot \text{gTG}^{-1}$)
15 °C	bei Versuchsbeginn	510	1,01
	nach 7 Tagen	430	0,96
24 °C	bei Versuchsbeginn	540	1,11
	nach 7 Tagen	190	1,23
33 °C	bei Versuchsbeginn	570	1,06
	nach 7 Tagen	580	1,23

Tab. 7: Veränderung des Coffeinmetabolismus nach einem Tag und nach 6 Tagen bei 15 °C bzw. 33 °C gegenüber 24 °C (Kontrolle); übrige Bedingungen 6,5 mbar Dampfdruckdefizit und 12 h Licht Stufe III; Durchschnittswerte aus jeweils 4 Blättern.

Temperatur- bedingungen (°C)	Theobromin- gehalt ($\mu\text{g} \cdot \text{gTG}^{-1}$)	MR ($\mu\text{g} \cdot \text{gTG}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)	MR _{koeff.} (%)	Coffein- gehalt (%TG)
bei 24 °C	90	190	1,21	1,39
nach 1 Tag bei 15 °C	200	90	0,45	1,37
nach 1 Tag bei 33 °C	35	55	1,13	1,38
nach 6 Tagen bei 15 °C	310	73	0,26	1,27
nach 6 Tagen bei 33 °C	1370	260	0,28	1,56

nehmen (siehe 3.2.2.). Im Kontrollversuch wird diese Erwartung erfüllt, bei 15 °C erfolgt dieses Absinken verlangsamt und bei 33 °C ist sogar ein leichtes Ansteigen feststellbar. Die Coffeinbiosynthese scheint den thermodynamischen Gesetzen folgend mit steigender Temperatur zuzunehmen.

In einem 2. Experiment wurde diese Vermutung bestätigt. Unter gleichen Bedingungen wie oben wurden zwei Pflanzengruppen während einer Woche bei 15 °C bez. 33 °C gehalten. Am 1. und 6. Tag wurden die Methylierungsraten bestimmt und mit einer Kontrollmessung bei 24 °C am Tag vor dem Versuch verglichen. Da in diesem Experiment keine Blattpaare verwendet werden konnten, sind nur die Methylierungskoeffizienten (siehe 2.6.2.) und die Coffeingehalte miteinander vergleichbar (Tab. 7).

Die Temperaturerniedrigung auf 15 °C bewirkt auch in diesem Versuch eine Abnahme des Coffeingehaltes während der 6tägigen Versuchsperiode von 1,37 % auf 1,27 %. Der Methylierungskoeffizient sinkt auf 0,44 nach einem Tag, bzw. auf 0,28 nach 6 Tagen. Daraus kann geschlossen werden, dass die Coffeinproduktion bei 15 °C etwa 3 - 4mal langsamer verläuft als bei 24 °C. Bei 33 °C steigt der Coffeingehalt innerhalb der 6 Tage von 1,38 % auf 1,56 % an. Die Methylierungsrate ist aber in der gleichen Zeit relativ zum Theobromingehalt etwa 4mal langsamer geworden. Die Alkaloidsynthese wird also durch eine Temperaturerhöhung deutlich gesteigert. Die Geschwindigkeit des letzten Methylierungsschrittes zum Coffein nimmt aber nicht proportional zu. Dies bewirkt ein relatives Ansteigen des Theobromingehaltes (Tab. 6).

Im 2. Experiment wurde neben der Alkaloidproduktion auch der CO₂-Gaswechsel gemessen (Abb. 14). Die Temperaturerniedrigung von 24 °C auf 15 °C bewirkt ein langsames Abfallen der durchschnittlichen Nettophotosynthese. Am 1. Tag werden etwa 90 %, am 6. Tag etwa 60 % des Wertes bei Standardbedingungen erreicht. Im Falle der Temperaturerhöhung auf 33 °C sinkt die CO₂-Aufnahme am 1. Tag um etwa 50 % gegenüber der Kontrollmessung ab. Nach 6 Tagen hat eine Adaption des Photosynthese-

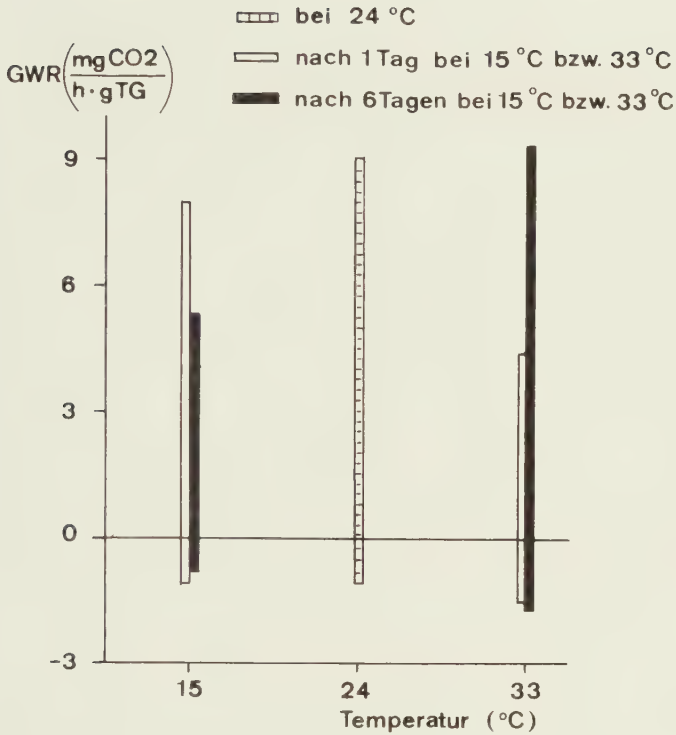


Abb. 14: Veränderung des CO_2 -Gaswechsels nach einem Tag und nach 6 Tagen bei 15 °C bzw. 33 °C gegenüber 24 °C (Kontrolle); übrige Bedingungen 6,5 mbar Dampfdruckdefizit, 12 h Licht Stufe III.

stoffwechsels an die veränderten Temperaturbedingungen stattgefunden. Die Assimilationsleistung ist wieder gleich hoch wie bei 24 °C. Die Dunkelatmungsrate verändert sich mehr oder weniger linear mit der Temperatur. Bei 15 °C ist eine 40 %ige Abnahme, bei 33 °C eine 50 %ige Zunahme nach 6 Tagen festzustellen.

4. DISKUSSION

4.1. COFFEINBILDUNG

Wie in der Einleitung dargestellt worden ist, wurde angenommen, dass die gemessenen Methylierungsraten ein Mass für die Geschwindigkeit der gesamten Coffeinbiosynthese seien. Eine Ueberschlagsrechnung zeigt, dass diese Annahme zutrifft. Aus Tab. 8 kann herausgelesen werden, dass der absolute Coffeingehalt pro Blatt von Altersstufe 1 bis Altersstufe 4 um 450 - 500 μg zunimmt, und die durchschnittliche Coffeinproduktion (über alle 4 Stufen) rund 10 $\mu\text{g}/\text{Tag}$ beträgt. Aus diesen beiden Daten kann man berechnen, dass ein Blatt 15 - 17 Tage Zeit braucht, um sich von einer Altersstufe zur anderen zu entwickeln. Anders ausgedrückt bedeutet dies, dass alle 2 1/2 Wochen ein neues Blattpaar entsteht. Diese Berechnung stimmt mit unseren Beobachtungen und den Messungen von BERGMANN et al. (1970) an jungen Freilandpflanzen in Kuba ziemlich genau überein.

Tab. 8: Absolute Methylierungsraten und Coffeingehalt (pro Blatt) bei verschiedenen Blattaltern; Altersstufe 1 entspricht den jüngsten, Altersstufe 4 den ältesten gemessenen Blättern; Durchschnittswerte aus jeweils 3 Blättern.

Altersstufe	Coffeingehalt ($\mu\text{g} \cdot \text{Blatt}^{-1}$)	MR ($\mu\text{g} \cdot \text{Blatt}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)
1	276	21
2	450	14
3	560	2,5
4	765	0,7

Die Alkaloidproduktivität der Gewebekulturen ist denjenigen der Blätter vergleichbar. Der Endgehalt an Purinalkaloiden (bezogen auf das TG) ist in Kalluskulturen gleich hoch wie in Blättern und in Zelllinien stark produzierender Suspensionskulturen nur leicht tiefer. Die Geschwindigkeit der Coffeinbiosynthese in stark produzierenden Suspensionskulturen ohne Zugabe von Theobromin entspricht etwa derjenigen in Blättern der Altersstufe 2 oder 3. In diesen Zelllinien kann zudem durch Zugabe von Theobromin die Coffeinbildung so stark stimuliert werden, dass sogar beinahe die Methylierungsraten der Blätter von Altersstufe 1 erreicht werden (Abb. 9A). Aber auch in schwach produzierenden Kulturen kann die Coffeinbildung durch Zugabe des Präkursors ausserordentlich stark erhöht werden (Abb. 9B). In diesem Fall kann man also durch Zugabe eines Vorläufers erreichen, dass eine Substanz, deren Biosynthese in der Gewebekultur nur noch schwach ist, wieder in grosser Menge gebildet wird. Dies weist darauf hin, dass in Gewebekulturen einzelne Enzyme eines für eine Biosynthese verantwortlichen Enzymsatzes auch dann in beträchtlicher Menge vorhanden sein können, wenn das Endprodukt nur in geringer Menge gebildet wird. Solche Biotransformationsleistungen sind vor allem für eine industrielle in vitro Produktion von pharmakologisch wichtigen sekundären Pflanzenstoffen, wie sie heute oft diskutiert wird (REINHARD 1977, ZENK 1978), von Bedeutung.

Wie der Versuch mit den verschiedenen vorgegebenen Coffeinemengen im Medium zeigt (Tab. 1), ist in Kalluskulturen die Coffeinbiosynthese nicht durch eine Endprodukthemmung im klassischen Sinne reguliert. Uebersteigt die Coffeinkonzentration im Kallusstück 400 $\mu\text{g/ml}$ Gewebe, so nehmen Wachstum und Coffeinbildung etwa in gleichem Masse ab; die Vitalität der Zellen scheint also reduziert zu sein. Noch höhere Coffeinkonzentrationen im Gewebe führen nach einiger Zeit zum Absterben der Zellen.

Es ist allgemein eines der herausragendsten Merkmale der sekundären Pflanzenstoffe, dass ihre Biosynthese an einen ganz bestimmten Entwicklungszustand des produzierenden Organs gebunden ist (LUCKNER 1980). Dies gilt auch für die Purinalkaloidbiosynthese in den Blättern. Im jüngsten Stadium, das gemessen wurde, wird Coffein 100mal schneller gebildet als im ältesten (Tab. 2).

Die Regulation des Coffeinstoffwechsels ist also eigentlicher Bestandteil im Programm der Entwicklung und Differenzierung des Blattes. Aeussere Faktoren können aber diesen Programmablauf beträchtlich verändern. Unsere Untersuchungen zeigen vor allem einen sehr grossen Einfluss der Temperatur (Tab. 6,7): bei einer Reduktion von 24 °C auf 15 °C ist eine deutliche Abnahme der Coffeinbiosynthese, bei einer Erhöhung auf 33 °C eine Zunahme zu beobachten. Bei 33 °C ist zudem eine Aenderung der Produktionskinetik festzustellen. Eventuell ein relativer Mangel an Methylendonatoren oder eine Endprodukthemmung durch das vermehrt anfallende Coffein bewirkt, dass der letzte Methylierungsschritt verlangsamt abläuft, was eine Akkumulation von Theobromin zur Folge hat.

Veränderte Lichtintensitäten haben - wenigstens für kurze Zeit - keinen Einfluss auf den Purinalkaloidstoffwechsel. Der Tag-Nacht Unterschied im Theobromingehalt muss daher als endogener Rhythmus interpretiert werden. BERGMANN et al. (1970) haben zwar in Sonnenblättern einen etwa 50 % höheren Gehalt an tetrachloressigsäure-löslichem Stickstoff (Aminosäuren, freie Nukleotide, Alkaloide) als in Schattenblättern gefunden. Dies dürfte aber weniger ein Einfluss des Lichtes als der Temperatur sein, da die Blätter in vollem Sonnenschein 10 - 15 °C höhere Temperaturen als die Umgebung haben, während diejenigen der beschatteten Blätter 1 - 2 °C darunter liegen (BUTLER 1977).

4.2. CO₂-GASWECHSEL

Die von uns unter Standardbedingungen während der konstanten Phase am Morgen gemessenen Nettophotosyntheseraten von 10 - 14

mg CO₂·gTG⁻¹·h⁻¹ bzw. 5 - 7 mg CO₂·dmBF⁻²·h⁻¹ liegen in der Mitte der Werte, die von andern Arbeitsgruppen unter ähnlichen äusseren Bedingungen bei Coffea arabica gefunden worden sind. NUTMAN (1937 a), BERGMANN et al. (1970) sowie GLAETTLI et al. (1980) haben Nettoassimilationsraten erhalten, welche tiefer liegen (3,5 - 4,5 mg CO₂·dmBF⁻²·h⁻¹) und NUNES et al. (1968) sowie KUMAR und TIESZEN (1980 a) solche die höher liegen (10 - 15 mg CO₂·dmBF⁻²·h⁻¹). Diese grossen Differenzen sind vermutlich hauptsächlich auf genetische Unterschiede der verwendeten Pflanzen zurückzuführen; NUNES et al. (1969) und SONDAHL et al. (1976) haben nämlich beträchtliche Differenzen im Photosynthesevermögen verschiedener Varietäten von Coffea arabica festgestellt. Daneben könnten aber auch die verschiedenen Anzuchtbedingungen einen Einfluss auf die Assimilationsraten gehabt haben.

Wie SCHNEIDER (1970) bei seinen Photosynthesemessungen von Coffea arabica aus Gewächshäusern ebenfalls festgestellt hat, nimmt die Assimilationsrate am Nachmittag stark ab. Dieser charakteristische Tagesgang tritt unter allen Versuchsbedingungen auf, also auch bei tiefen Beleuchtungsstärken, wenn die Nettophotosyntheseraten unter dem bei dieser Temperatur möglichen Maximum liegen. Eine Hemmung der CO₂-Aufnahme durch akkumulierte Assimilationsprodukte scheint daher ausgeschlossen. Vermutlich ist auch nicht Wassermangel dafür verantwortlich, da immer darauf geachtet wurde, dass die Erde in den Töpfen vollständig wassergetränkt war.

Ähnliche Phänomene sind auch bei Freilandpflanzen von Coffea arabica beobachtet worden. NUTMAN (1937 a) hat an sonnigen Tagen eine Abnahme der Nettophotosynthese über die Mittagszeit gemessen, welche er nicht durch übermässigen Wasserverlust der Blätter oder sich anhäufende Assimilationsprodukte erklären konnte. Bei weiteren Untersuchungen hat er festgestellt (1937 b), dass ein Schliessen der Spaltöffnungen bei höheren Lichtintensitäten als 0,9 cal·cm²·min⁻¹ für dieses Absinken verantwortlich war. KUMAR und TIESZEN (1980 b) haben

den Wasserhaushalt von mehrjährigen Kaffeepflanzen in plantage-ähnlichen Pflanzungen Kenyas studiert. Aus ihrer Arbeit geht hervor, dass die Spaltöffnungen nach 15.00 h schliessen, obschon das Wasserpotential in den Blättern nach einem Abfall um die Mittagszeit am Nachmittag wieder so hoch ist wie am Morgen. Vermutlich ist die von uns beobachtete Abnahme der Nettophotosynthese ebenfalls auf ein Schliessen der Spaltöffnungen zurückzuführen. Dieses kann aber nicht mit ökophysiologisch relevanten Faktoren in Zusammenhang gebracht werden, sondern muss auf innere Regulationsmechanismen zurückgeführt werden.

NUNES et al. (1968) sowie KUMAR und TIESZEN (1980 a) haben den CO_2 -Gaswechsel bei verschiedenen Temperaturen untersucht. In beiden Arbeiten wird ein Temperaturoptimum der Nettophotosynthese von etwa 24°C angegeben; bei höheren Temperaturen berichten sie über eine starke Abnahme der Assimilationsraten. GLAETTLI et al. (1980) haben jedoch festgestellt, dass die CO_2 -Aufnahme in hohem Masse von der Temperatur der vorangegangenen Tage abhängig ist. Messreihen, welche bei aufsteigenden Temperaturen durchgeführt wurden, ergaben ein anderes Temperaturoptimum der Photosynthese als solche, die bei absteigenden Temperaturen durchgeführt wurden. Im 1. Fall lag das Optimum bei 30°C , im 2. Fall bei 20°C . Aus unseren Messungen geht ebenfalls hervor, dass die Nettophotosynthese durch die Temperatur der vorangegangenen Tage stark beeinflusst wird. Die Adaptationszeit bei einer Temperaturänderung von 9°C liegt zwischen 3 und 6 Tagen. Das Temperaturoptimum der Nettophotosynthese ist nach Abwarten dieser Anpassungszeit sehr breit. Es liegt zwischen 24°C und 33°C (Abb. 14).

4.3. VERGLEICH DES COFFEINMETABOLISMUS MIT DEM PRIMAER-STOFFWECHSEL

Obwohl, wie aus Untersuchungen von WEEVERS (1930) an verschiedenen coffeinhaltigen Pflanzen hervorgeht, dieses Alkaloid vorwiegend in den grünen Pflanzenteilen vorkommt und im Holz sowie, von einigen Ausnahmen abgesehen, in den unterirdischen Teilen fehlt, konnten wir keine Beziehung zwischen Photosyn-

these und Coffeinstoffwechsel finden. Die Resultate aus den meisten unserer Experimente lassen auf einen engen Zusammenhang zwischen Purinalkaloidbildung und Grundstoffwechsel schliessen. In Kalluskulturen nimmt das Trockengewicht stets parallel dem Coffeingehalt zu. In Blättern ist die Coffeinbildung dann am grössten, wenn hohe Wachstums- und/oder Respirationsraten auftreten, das heisst am Anfang ihrer Entwicklung oder bei erhöhten Temperaturen. Scheinbar im Gegensatz zu den oben dargestellten Befunden wird in Suspensionskulturen der grösste Teil des Endgehaltes an Purinalkaloiden nach der Zeit des schnellsten Wachstums, am Ende der Kulturperiode, gebildet (Abb. 7). Dies lässt sich aber dadurch erklären, dass während dieser stationären Phase des Wachstums grosse Mengen an Abbauprodukten entstehen, die zu Coffein metabolisiert werden. Wie viele andere sekundäre Pflanzenstoffe scheint also auch das Coffein primär zur schnellen inneren Entgiftung des Stoffwechsels gebildet zu werden.

Verglichen mit den beiden in der Einleitung erwähnten Hypothesen über den Zusammenhang zwischen Coffeinbiosynthese und Primärstoffwechsel, welche auf Grund biochemischer Untersuchungen zustandegekommen sind, würde daher eher diejenige von KREMERS (1954) und ihre Erweiterungen von BAUMANN et al. (1978) zutreffen. Wenn in einem Gewebe mit sehr grosser Stoffwechselaktivität Zwischenprodukte des Abbaus von NAD oder anderen adeninhaltigen Nukleotiden eine so hohe Konzentration erreichen, dass bei einem vollständigen Katabolismus eine toxische Ammoniakkonzentration entstehen würde, dann werden diese Zwischenprodukte zu Coffein umgebildet, einer Substanz, welche stoffwechselträge ist und zudem an einem plasmafernen Ort (Zellwand, PFRUNDER 1980) gelagert wird.

Im Hinblick auf eine Anwendung in der Praxis wäre es natürlich sehr lohnend, die Zusammenhänge zwischen Purinalkaloidstoffwechsel und Entwicklungszustand des Gewebes auch an coffeinhaltigen Organen zu studieren, welche als Genussmittel verwendet

werden. Mit einer einfachen Theobrominbestimmung liessen sich möglicherweise der Entwicklungszustand und das Wachstumspotential der reifenden Kaffeebohnen abschätzen, oder beim Tee Aussagen über die Qualität machen, da das Blattalter entscheidend für die Güte ist.

5. ZUSAMMENFASSUNG

1. In Gewebekulturen und Blättern der Kaffeepflanze (Coffea arabica) wurden gleichzeitig verschiedene Parameter des Primärstoffwechsels (TG-Zunahme, Nettophotosynthese, Dunkelatmung) und die Geschwindigkeit der Purinalkaloidproduktion untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Geschwindigkeit des letzten Schrittes in der Coffeinbiosynthese, die Methylierung vom Theobromin (3,7-Dimethylxanthin) zum Coffein (1,3,7-Trimethylxanthin) ein gutes Mass für die Geschwindigkeit der gesamten Purinalkaloidbiosynthese darstellt. Gemessen wurde diese Methylierungsrate durch Zugabe von $[2-^{14}\text{C}]$ Theobromin.
2. In einer Kalluskultur liegt der prozentuale Coffeingehalt (auf das TG bezogen) zwischen 1,0 und 1,6 %; er entspricht damit etwa demjenigen von Kaffeebohnen oder Blättern. Die Coffeinbildung verläuft stets parallel zur TG-Zunahme. Der Alkaloidgehalt (Coffein und Theobromin) von Suspensionskulturen ist im Vergleich zu den Kalluskulturen tiefer und stark variierend (0,03 - 0,7 % des TG). Der grösste Teil des Endgehaltes wird nach der exponentiellen Phase des Wachstums gebildet.
3. Der Purinalkaloidmetabolismus in den Blättern ist in erster Linie von deren Alter abhängig. Die Geschwindigkeit der Coffeinbiosynthese ist im jüngsten von 4 aufeinanderfolgenden Blättern eines Zweiges etwa 100mal schneller als im ältesten. In der gleichen Entwicklungsspanne sinkt auch der Theobromingehalt um diesen Faktor ab. Daneben wird die Coffeinbildung aber auch durch äussere Faktoren (Temperatur, Tag-Nacht-Rhythmus) beeinflusst.
4. Die Gaswechsellmessungen ergaben ebenfalls deutliche Unterschiede zwischen den Blättern verschiedener Altersstufen. Die Assimilationsraten sind in den ältesten Blättern am höchsten, die Dunkelatmungsraten in den jüngsten. Messungen bei verschiedenen Temperaturen mit und ohne Anpassungszeit zeigten, dass der CO_2 -Gaswechsel sowohl durch die aktuelle Temperatur als auch durch diejenige der vergangenen Tage beeinflusst wird. Unter allen Versuchsbedingungen konnte eine starke Abnahme der

Nettophotosynthese am Nachmittag beobachtet werden, welche weder durch Wassermangel noch durch akkumulierte Assimilate erklärt werden kann.

5. Aus einem Vergleich des Purinalkaloidstoffwechsels mit den verschiedenen Parametern des Primärstoffwechsels geht hervor, dass mit der Möglichkeit Coffein zu bilden primär ein Mechanismus zur inneren Entgiftung realisiert ist. Weiter wird diskutiert, wie sich die Resultate aus diesen physiologischen Untersuchungen mit den biochemischen Hypothesen über den Zusammenhang zwischen Primärstoffwechsel und Coffeinbiosynthese verbinden lassen.

ABKUERZUNGEN

BF	Blattfläche
2,4-D	Dichlorphenoxyessigsäure
DC	Dünnschicht-Chromatographie
GWR	Gaswechselrate
HPLC	Hochleistungsflüssig - Chromatographie
LM	Lösungsmittel
MR	Methylierungsrate
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
Phn	Nettophotosyntheserate
Rd	Dunkelatmungsrate
TG	Trockengewicht

VERDANKUNGEN

Mein herzlicher Dank geht an Herrn PD Dr. T.W. Baumann für die wertvolle Beratung beim Ausführen der Experimente, die lehrreichen Gespräche und die kritische Durchsicht des Manuskriptes, an Herrn PD Dr. B.M. Eller für die grosszügige Unterstützung beim Aufbau der Gaswechsellmessanlage und an Herrn Prof. Dr. H. Wanner für sein stetes Interesse am Entstehen dieser Arbeit.

Bei Fräulein Eveline Oertle möchte ich mich für die technische Hilfe beim Herstellen von Tracern bedanken und beim Schweizerischen Verkehrsverein für das Ueberlassen zweier Abbildungen.

Diese Arbeit wurde vom Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Gesuch 3.168.77) unterstützt.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- ALFERMANN, A.W., BOY, H.M., DOELLER, P.C., HAGEDORN, W., HEINS, M., WAHL, J. and REINHARD, E.: Biotransformation of cardiac glycosides by plant cell cultures. In: BARZ, W., REINHARD, E. and ZENK, M.H., Plant Tissue Culture and Its Bio-technological Application, p.125-141, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1977).
- AYREY, G. and YEOMANS, M.A.: Carbon-14 ring labelling of some methylxanthines of pharmacological importance. J. Lab. Cmps. 12(3), 323 - 345 (1976).
- BAUMANN, T.W., DUPONT-LOOSER, E. and WANNER, H.: 7-Methyl-xanthosine - An intermediate in caffeine biosynthesis. Phytochem. 17, 2075 - 2076 (1978).
- BERGMANN, H., LERCH, G. und MUENTZ, K.: Ueber die physiologische Wirkung von Sonne und Schatten auf Coffea arabica L."caturra" unter Freilandbedingungen in Kuba. II. Stoffwechsel von Jungpflanzen. Z. Pflanzenphysiol. 63, 444 - 460 (1970).
- BREDERECK, H., VON SCHUH, H.G. und MARTINI, A.: Neue Synthesen von Xanthin, Coffein und Theobromin. Ber. Dtsch. Chem. Ges. 83, 201 - 211 (1950).
- BREITNER, J., HELGER, R. and LANG, H.: Evaluation of column extraction: A new procedure for the analysis of drugs in body fluids. Forensic Sci. 7, 131 - 140 (1976).
- BUCKLAND, E. and TOWNSLEY, P.M.: Coffee cell suspension cultures caffeine and chlorogenic acid content. Can. Inst. Food Sci. Technol. J. 8(3), 164 - 165 (1975).
- BUTLER, D.R.: Coffee leaf temperatures in a tropical environment. Acta Bot. Neerl. 26(2), 129 - 140 (1977).
- CHARRIER, A. et BERTHAUD, J.: Variation de la teneur en caféine dans le genre Coffea. Café, Cacao, Thé 19(4) 251 - 264 (1975).

- FISCHER, E.: Synthese des Theobromins. Ber. Dtsch. Chem. Ges. 30, 1839 - 1845 (1897).
- GLAETTLI, R., ELLER, B.M. und WANNER, H.: Temperaturabhängigkeit der Dunkelatmung und der Nettophotosynthese bei Coffea arabica L. Ber. Schweiz. Bot. Ges. (1980, im Druck).
- HAGBERG, W. A. F.: A device for injecting solutions and suspensions into thin leaves of plants. Can. J. Bot. 48, 1135 - 1136 (1970).
- HARBORNE, J. B.: Introduction to ecological biochemistry. Academic Press, London (1977).
- KALBERER, P.: Breakdown of caffeine in the leaves of Coffea arabica L. Nature 205, 597 - 598 (1965).
- KELLER, H., WANNER, H. und BAUMANN, T.W.: Kaffeinsynthese in Früchten und Gewebekulturen von Coffea arabica. Planta 108, 339 - 350 (1972).
- KOGAN, L., DI CARLO, F.J. and MAYNARD, W.E.: Determination of caffeine and trigonelline in coffee by paper chromatography. Analyt. Chem. 25, 1118 - 1120 (1953).
- KREMER, R.E.: Speculation on DPN as a biochemical precursor of caffeine and trigonelline in coffee. J. Amer. Pharm. Ass. 43, 423 - 424 (1954).
- KUMAR, D. and TIESZEN, L.L.: Photosynthesis in Coffea arabica. I. Effects of light and temperature. Expl. Agric. 16, 13 - 19 (1980 a).
- KUMAR, D. and TIESZEN, L.L.: Photosynthesis in Coffea arabica. II. Effects of water stress. Expl. Agric. 16, 21 - 27 (1980 b).
- LOOSER, E., BAUMANN, T.W. and WANNER, H.: The biosynthesis of caffeine in the coffee plant. Phytochem. 13, 2515 - 2518 (1974).

- LUCKNER, M.: Expression and control of secondary metabolism.
In: BELL, E.A. and CHARLWOOD, B.V., Secondary Plant
Products, Encyclopedia of Plant Physiology, New Series,
Vol. 8, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1980).
- MURASHIGE, T. and SKOOG, F.: A revised medium for rapid
growth and bioassays with tobacco tissue cultures.
Physiol. Plantarum 15, 473 - 497 (1962).
- NUNES, M.A., BIERHUIZEN, J.F. and PLOEGMAN, C.: Studies on
productivity of coffee. I. Effects of light, temperature
and CO₂ concentration on photosynthesis of Coffea
arabica. Acta Bot. Neerl. 17(2), 93 - 102 (1968).
- NUNES, M.A., BIERHUIZEN, J.F. and PLOEGMAN, C.: Studies on
productivity of coffee. III. Differences in photo-
synthesis between four varieties of coffee. Acta Bot.
Neerl. 18(3), 420 - 424 (1969).
- NUTMAN, F.J.: Studies of the physiology of Coffea arabica.
I. Photosynthesis of coffee leaves under natural con-
ditions. Ann. Bot., N. S. 1(3), 353 - 367 (1937 a).
- NUTMAN, F.J.: Studies of the physiology of Coffea arabica.
II. Stomatal movements in relation to photosynthesis
under natural conditions. Ann. Bot., N. S. 1(4),
681 - 693 (1937 b).
- OGUTUGA, D.B.A. and NORTHCOTE, D.H.: Caffeine formation in
tea callus tissue. J. Exp. Bot. 21, 258 - 273 (1970).
- PFRUNDER, R., WANNER, H., FRISCHKNECHT, P.M. and BAUMANN, T.W.:
An attempt to localize caffeine in the cell by its
washout kinetics. In: 9^e Colloque Scientifique internatio-
nal du Café, ASIC, London, 16-20 june 1980 (1980, im Druck).
- PREUSSER, E.: Zur Biosynthese des Coffeins. Biol. Zentral-
blatt 86, 485 - 494 (1967).
- ROBERTS, M.F. and WALLER, G.R.: N-methyltransferases and
7-methyl-N⁹-nucleotide-hydrolase activity in Coffea
arabica and the biosynthesis of caffeine. Phytochem.
18, 451 - 455 (1979).

- SESTAK, Z., CATSKY, J. and JARVIS, P.G.: Plant photosynthetic production. Manual of methods. Junk, The Hague (1971).
- SCHNEIDER, K.: Eine Methode zur Bestimmung der reellen CO₂-Photosyntheserate und ihre Anwendung auf die Messung der CO₂-Gaswechselraten bei Coffea arabica Ber. Schweiz Bot. Ges. 79, 279 - 312 (1970)
- SONDAHL, M.R., CROCOMO, O.J. and SODEK, L.: Measurements of ¹⁴C incorporation by illuminated intact leaves of Coffee plants from gas mixtures containing ¹⁴CO₂. J. exp. Bot. 27, 1187 - 1195 (1976).
- SUZUKI, T. and TAKAHASHI, E.: Biosynthesis of caffeine by tea-leaf extracts. Biochem. J. 146, 87 - 96 (1975).
- SUZUKI, T. and TAKAHASHI, E.: Caffeine biosynthesis in Camellia sinensis. Phytochem. 15, 1235 - 1239 (1976).
- TEUSCHER, E.: Probleme der Produktion sekundärer Pflanzenstoffe mit Hilfe von Zellkulturen. Pharmazie 28, 6 - 18 (1973).
- TRAUBE, W.: Der synthetische Aufbau der Harnsäure, des Xanthins, Theobromins, Theophyllins und Caffeins aus der Cyanessigsäure. Ber. Dtsch. Chem Ges. 33, 3035 - 3056 (1906).
- WEEVERS, T.: Die Funktion der Xanthinderivate im Pflanzenstoffwechsel. Arch. neerl. Sci. III B 5, 111 - 195 (1930).
- ZENK, M.H., EL-SHAGI, H., ARENS, H., STOECKIGT, J., WEILER, E.W. and DEUS, B.: Formation of the indole alkaloids serpentine and ajmalicine in cell suspension cultures of Catharanthus roseus. In: BARZ, W., REINHARD, E. and ZENK, M.H., Plant Tissue Culture and Its Bio-technological Application, p. 27 - 43, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, (1977).
- ZENK, M. H.: The impact of plant cell culture on industry. In: Frontiers of plant tissue culture 1978, proceedings of the 4th international congress of plant tissue and cell culture, IAPTC, Calgary, 20 - 25 august 1978 (1978).

PUBLIKATIONEN

Einzelne Teile dieser Dissertation wurden publiziert:

FRISCHKNECHT, P.M., BAUMANN, T.W. and WANNER, H.: Tissue culture of Coffea arabica: Growth and caffeine formation. Planta medica 31 (4), 344 - 350 (1977).

FRISCHKNECHT, P.M. and BAUMANN, T.W.: Synthesis of $[2-^{14}\text{C}]$ theobromine. J. Lab. Cpds. 16 (5), 669 - 672 (1979).

FISCHKNECHT, P.M. and BAUMANN, T.W.: The pattern of purine alkaloid formation in suspension cultures of Coffea arabica. Planta medica (1980, im Druck).

CURRICULUM VITAE

von Peter Markus Frischknecht, geboren am 17. 5. 1952 in
Zürich, Bürger von Schwellbrunn AR

1959 - 1965	Primarschule in Thalwil
1965 - 1971	Gymnasium Zürich Freudenberg
	Maturitätsabschluss Typus B
1971 - 1972	Sprachaufenthalt in Paris
1972	Immatrikulation an der Philosophischen Fakultät II der Universität Zürich
1976	Diplom für Naturwissenschaften
1976 - 1980	Doktorarbeit unter der Leitung von Herrn PD Dr. T.W. Baumann, Herrn PD Dr. B.M. Eller und Herrn Prof. Dr. H. Wanner am Institut für Pflanzenbiologie seit 1976 Assistent am gleichen Institut

Während meines Studiums besuchte ich bei folgenden Dozenten
Vorlesungen, Kurse und Praktika:

Mathematik	Prof. E. Batschelet+, J.P. Tacier
Chemie	Prof. C.H. Eugster, Prof. H.R. Oswald Dr. P. Rüedi, Prof. H. Schmid+
Anthropologie und Physiologie des Menschen	Prof. J. Biegert, Prof. R. Hunsperger, Prof. S. Kubik Dr. W. Scheffrahn
Zoologie	Prof. H. Burla, Prof. P.S. Chen, PD A. Düben- dorfer, Prof. H. Kummer, Dr. G. Mindek, Prof. R. Nöthiger, Prof. P. Tardent, Prof. R. Wehner, Prof. V. Ziswiler
Botanik	PD T.W. Baumann, Prof. C.D.K. Cook, PD B.M. Eller, Prof. H.R. Hohl, Prof. D. Rast, Prof. O. Rohweder, Prof. H. Schaeppi, Prof. J. Schlittler, B. Stüssi, Prof. H. Wanner
Didaktik und Lehrübungen	Dr. M. Greuter, Prof. O. Woodtli

